БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА

Р. Марри
Д. Греннер
П. Мейес
В. Родуэлл

1



ИЗДАТЕЛЬСТВО
‹МИР›

БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА

a LANGE medical book
1988

HARPER'S BIOCHEMISTRY

Twenty-first Edition

Robert K. Murray, MD, PhD
Professor of Biochemistry
University of Toronto

Daryl K. Granner, MD
Professor and Chairman
Department of Molecular Physiology and Biophysics
Professor of Medicine
Vanderbilt University Nashville,
Tennessee

Peter A. Mayes, PhD, DSc
Reader in Biochemistry
Royal Veterinary College
University of London

Victor W. Rodwell, PhD
Professor of Biochemistry
Purdue University West Lafayette,
Indiana

APPLETON & LANGE
Norwalk, Connecticut/San Mateo, California

Р. Марри
Д. Греннер
П. Мейес
В. Родуэлл

БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА

В 2-х томах
Том 1

Перевод с английского
канд. физ.-мат. наук В. В. Борисова
и Е. В. Дайниченко

под редакцией
д-ра хим. наук Л. М. Гинодмана



МОСКВА «МИР» 1993

УДК 577.2
ББК 20.070
Б63

Авторы: Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.
Б63 **Биохимия человека:** В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ.: – М.: Мир, 1993. – 384 с., ил.
ISBN 5-03-001774-7

Настоящий учебник биологической и медицинской химии и молекулярной биологии широко известен в мире и переведен на многие языки. Авторы 21-го, переработанного издания – ученые из США, Великобритании и Канады. Благодаря энциклопедической полноте и четкости изложения книга может служить справочным пособием. На русском языке учебник выходит в 2-х томах. В первом томе рассматриваются следующие темы: структура и функция белков, биоэнергетика, метаболизм углеводов и липидов, обмен белков и аминокислот.

Для биохимиков, клинических биохимиков, студентов и аспирантов биологов и медиков.

ББК 20.070

Федеральная целевая программа книгоиздания России

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001774-7 (русск.)
ISBN 5-03-001773-9
ISBN 0-8385-3648-4 (англ.)

© 1988 by Appleton & Lange,
Publishing Division of Prentice Hall
© перевод на русский язык, Борисов В.В.,
Дайниченко Е.В., 1993

Предисловие к русскому изданию

К настоящему времени в области биохимии человека и животных создана хорошая стартовая площадка для успешного развития дальнейших исследований. Выяснены функции многих простых и сложных биомолекул; при этом главными достижениями являются установление информационной роли ДНК и расшифровка механизма передачи информации от ДНК к белку. Выделены главные органеллы клеток животных, установлены их основные функции. Получены в высокоочищенном виде многие ферменты, охарактеризованы механизмы регуляции их активности. Изучены формы запасания и использования энергии. Достигнуты существенные успехи в изучении структуры и функции мембран. Выяснено действие главных гормонов. Установлены биохимические нарушения, лежащие в основе ряда заболеваний.

Вместе с тем остается еще немало проблем, требующих изучения. К их числу относится выяснение механизмов регуляции и координации процессов жизнедеятельности; на начальных стадиях находятся, в частности, исследования по расшифровке механизмов регуляции экспрессии генов, с которыми связаны процессы роста и деления клеток, их дифференцировка, а при патологии — опухолевая трансформация. Весьма ограниченны сведения о механизмах клеточной секреции. Остается неясной природа многих наследственных заболеваний. Не удается пока сформулировать конструктивного представления о сложных биохимических процессах, лежащих в основе функционирования центральной нервной системы.

Предлагаемый вниманию читателей учебник биохимии достаточно полно освещает достижения биохимии человека и животных. Он вышел за рубежом 21-м изданием, что несомненно свидетельствует о его достоинствах. В первую очередь учебник предназначен для студентов-медиков, а также врачей, изучающих биохимические процессы, лежащие в основе функционирования здорового организма, нарушение которых сопровождается патологическими явлениями. Такая направленность учебника нашла отражение и в его названии при переводе на русский язык — «Биохимия человека» (так же называется и вводная глава учебника). В каждой главе после введения следует раздел «Биомедицинское значение», в котором отмечены основные вопросы, имеющие непосредственное отношение к медицине. Многие главы завершаются разделом «Клинические аспекты», в котором указаны заболевания, связанные с нарушениями рассмотренных в данной главе процессов метаболизма, и охарактеризованы (если они имеют место) изменения содержания соответствующих метаболитов в крови и в моче. Следует подчеркнуть, что в учебнике весьма обстоятельно изложены сведения о метаболизме липидов, обычно весьма кратко освещаемые в других руководствах; в то же время нарушение метаболизма липидов имеет непосредственное отношение к таким заболеваниям, как атеросклероз и ишемическая болезнь сердца. В учебник включены главы «Питание, пищеварение и всасывание», «Плазма крови и процессы свертывания», «Рак, онкогены и факторы роста», представляющие особый интерес для медиков. Завершает учебник раздел, в котором приведены обоснование лабораторных биохимических анализов, интерпретация их результатов и использование в диагностике.

Учебник несомненно заинтересует не только медиков; он будет весьма полезным и для широкого круга биологов, интересующихся основами биохимии. Он содержит четкое и достаточно лаконичное изложение биохимии и молекулярной биологии [1], при этом в тексте отражены достижения биохимии последнего времени. Учебник иллюстрирован большим числом рисунков и схем, которые способствуют усвоению материала и могут быть использованы при преподавании биохимии.

Л. М. Гинодман

---

[1] Более подробное изложение ряда разделов биохимии можно найти в других учебниках, выпущенных издательством «Мир»: Д. Мецлер, «Биохимия», в трех томах (1980); А. Уайт и др., «Основы биохимии», в трех томах (1981); Л. Страйер, «Биохимия», в трех томах (1984—5); А. Ленинджер, «Основы биохимии», в трех томах (1985).— *Прим. ред.*

Предисловие

В предлагаемом пособии мы попытались кратко, но вполне исчерпывающим образом изложить принципы, лежащие в основе биохимии и молекулярной биологии. Мы рассмотрели также биохимические аспекты некоторых патологических состояний, что позволяет познакомить студентов-медиков с клиническими проявлениями и последствиями нарушений биохимических процессов.

Изменения в 21-м издании

При подготовке нового издания авторы ставили перед собой главным образом две задачи: отразить новейшие достижения биохимии, важные с медицинской точки зрения, и сделать изложение более интересным и доступным. Поэтому были внесены следующие изменения.

● Книга состоит из шести больших разделов, что делает яснее логику ее построения. Крупные главы были разделены на более компактные, некоторые главы перенесены в другие разделы, где они более логично вписываются в текст.

● Добавлены две вводные главы. Гл. 1 («Биохимия и медицина») иллюстрирует тесную связь между биохимией и медициной. Студенты найдут в ней ряд интересных и важных примеров использования биохимии в медицинской науке. В гл. 2 («Биомолекулы и биохимические методы») кратко охарактеризованы основные типы молекул, присутствующих в клетках, а также методы, используемые для их изучения. Тем самым заложен фундамент для всего последующего изложения. Описаны наиболее значительные открытия, сделанные в биохимии, упомянуты перспективные направления исследований, ведущихся в настоящее время.

● Каждая глава начинается с небольшого введения, в котором кратко излагается содержание главы и оценивается степень важности представленного материала.

● Сразу за введением следует небольшой раздел «Биомедицинское значение», в котором подчеркиваются те затронутые в главе вопросы, которые имеют отношение к медицине.

● Новая глава «Промежуточный обмен» (гл. 16) придает тематическое единство всем главам о метаболизме.

● Новая глава «Технология рекомбинантных ДНК» (гл. 36) дает представление об используемых принципах и методах и о том мощном влиянии, которое техника рекомбинантных ДНК оказала на развитие биологии и медицины.

● Добавлена специальная глава «Рак, онкогены и факторы роста» (гл. 57), которая вводит студентов в курс проблем в этой области и указывает на фундаментальный характер биохимической информации, получаемой при изучении онкогенеза и факторов роста.

● Добавлено также «Приложение», в котором представлены основные лабораторные биохимические методы анализа, используемые в клинической медицине. Рассмотрены оценки чувствительности и специфичности этих методов. Приложение призвано помочь студентам перекинуть мостик между общей и клинической биохимией и оценить диагностические возможности многих биохимических тестов.

Кроме того, все главы приведены в соответствие с сегодняшним уровнем научных знаний. Дополнительно, ввиду их особого интереса, обсуждаются следующие темы.

- Мембраны (в гл. 43).
- Питание, пищеварение и абсорбция (в гл. 53).
- Гликопротеины (в гл. 54).

План книги

Текст содержит две вводные главы и шесть крупных разделов.

Раздел I посвящен белкам и ферментам — «рабочим лошадкам» организма. Поскольку почти все реакции, протекающие в клетке, катализируются ферментами, необходимо уяснить свойства ферментов, прежде чем рассматривать остальные вопросы.

Раздел II содержит сведения о том, как всевозможные протекающие в клетке реакции связаны с выработкой или потреблением энергии. Здесь же прослеживаются пути синтеза и распада углеводов и липидов. Обсуждаются функции различных представителей этих двух классов веществ.

Раздел III посвящен аминокислотам. Прослеживается судьба этих молекул, их метаболизм, тоже связанный с выработкой и потреблением энергии.

Раздел IV описывает структуру и функции нуклеиновых кислот в рамках схемы ДНК → РНК → белок. В этот раздел включена новая глава о принципах технологии рекомбинантных ДНК, открывшей новые перспективы развития биомедицинской науки.

Раздел V посвящен гормонам и их ключевой роли в межклеточных коммуникациях и в регуляции метаболизма. Воздействие гормонов на клетки неизбежно опосредуется их взаимодействием с плазматическими мембранами, поэтому предварительно рассматриваются структура и функции мембран.

Раздел VI затрагивает пять специальных тем, включая новую главу «Рак, онкогены и факторы роста».

Приложение содержит краткое описание биохимических лабораторных анализов, интерпретацию результатов и использование их в диагностических целях.

Благодарности

Авторы высоко оценивают большой вклад в создание пособия, внесенный д-ром Дейвидом Мартином в тот период, когда он возглавлял авторский коллектив. Многое из того, что внес д-р Мартин, сохранилось и в настоящем издании. Руководство подготовкой этого издания взял на себя д-р Роберт Марри, старавшийся работать столь же энергично и проявить такую же высокую биохимическую компетентность, какая была свойственна д-ру Мартину.

Авторы выражают благодарность коллегам и друзьям из разных стран, от которых поступили предложения по улучшению книги, а также ряд исправлений. Мы рассчитываем на их участие и интерес и в будущем. Мы приветствовали бы любые замечания и со стороны студентов.

Авторы особенно благодарны за то широкое признание и поддержку, которые эта книга получила во всем мире. Несколько изданий на английском языке были перепечатаны в Японии, Ливане, на Тайване, на Филиппинах и в Корее. Кроме того, книга была переведена на итальянский, испанский, французский, португальский, японский, польский, немецкий, индонезийский, сербскохорватский и греческий языки.

Октябрь, 1987

Р.К.М.
Д.К.Г.
П.А.М.
В.У.Р.

Глава 1

Биохимия и медицина

Роберт Марри

ВВЕДЕНИЕ

Биохимия — это наука, занимающаяся изучением различных молекул, химических реакций и процессов, протекающих в живых клетках и организмах. Основательное знание биохимии совершенно необходимо для успешного развития двух главных направлений биомедицинских наук: 1) решение проблем сохранения здоровья человека; 2) выяснение причин различных болезней и изыскание путей их эффективного лечения.

БИОХИМИЯ И ЗДОРОВЬЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет здоровье как состояние «полного физического, духовного и социального благополучия, которое не сводится к простому отсутствию болезней и недомоганий». Со строго биохимической точки зрения организм можно считать здоровым, если многие тысячи реакций, протекающих внутри клеток и во внеклеточной среде, идут в таких условиях и с такими скоростями, которые обеспечивают максимальную жизнеспособность организма и поддерживают физиологически нормальное (не патологическое) состояние.

БИОХИМИЯ, ПИТАНИЕ, ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

Одной из главных предпосылок сохранения здоровья является оптимальная диета, содержащая ряд химических веществ; главными из них являются витамины, некоторые аминокислоты, некоторые жирные кислоты, различные минеральные вещества и вода. Все эти вещества представляют тот или иной интерес как для биохимии, так и для науки о рациональном питании. Следовательно, между этими двумя науками существует тесная связь. Кроме того, можно полагать, что на фоне усилий, прилагаемых к тому, чтобы сдержать рост цен на медицинское обслуживание, все большее внимание будет уделяться сохранению здоровья и предупреждению болезней, т.е. профилактической медицине. Так, например, для предупреждения атеросклероза и рака со временем, вероятно, все большее значение будет придаваться рациональному питанию. В то же время концепция рационального питания должна основываться на знании биохимии.

БИОХИМИЯ И БОЛЕЗНИ

Все болезни представляют собой проявление каких-то изменений в свойствах молекул и нарушений хода химических реакций и процессов. Основные факторы, приводящие к развитию болезней у животных и человека, приведены в табл. 1. 1. Все они оказывают влияние на одну или несколько ключевых химических реакций или на структуру и свойства функционально важных молекул.

Вклад биохимических исследований в диагностику и лечение заболеваний сводится к следующему.

Таблица 1.1. Основные факторы, приводящие к развитию болезней. Все они оказывают влияние на различные биохимические процессы, протекающие в клетке или целом организме [1]

1. **Физические факторы:** механическая травма, экстремальная температура, резкие изменения атмосферного давления, радиация, электрический шок
2. **Химические агенты и лекарственные препараты:** некоторые токсические соединения, терапевтические препараты и т. д.
3. **Биологические агенты:** вирусы, риккетсии, бактерии, грибы, высшие формы паразитов
4. **Кислородное голодание:** потеря крови, нарушение кислородпереносящей функции, отравление окислительных ферментов
5. **Генетические факторы:** врожденные, молекулярные
6. **Иммунологические реакции:** анафилаксия, аутоиммунные заболевания
7. **Нарушения пищевого баланса:** недостаточное питание, избыточное питание

[1] Из книги Robbins S. L., Cotram R. S., Kumar V.: The Pathologic Basis of Disease, 3rd ed. Saunders, 1984, с некоторыми изменениями, с любезного разрешения авторов.

Благодаря этим исследованиям можно 1) выявить причину болезни; 2) предложить рациональный и эффективный путь лечения; 3) разработать методики для массового обследования населения с целью ранней диагностики; 4) следить за ходом болезни; 5) контролировать эффективность лечения. В Приложении описаны наиболее важные биохимические анализы, используемые для диагностики различных заболеваний. К этому Приложению будет полезно обращаться всякий раз, когда будет идти речь о биохимической диагностике различных болезней (например, инфаркта миокарда, острого панкреатита и др.).

Возможности биохимии в отношении предупреждения и лечения болезней кратко проиллюстрированы на трех примерах; позднее в этой же главе мы рассмотрим еще несколько примеров.

1. Хорошо известно, что для поддержания своего здоровья человек должен получать определенные сложные органические соединения — **витамины**. В организме витамины превращаются в более сложные молекулы (коферменты), которые играют ключевую роль во многих протекающих в клетках реакциях. Недостаток в диете какого-либо из витаминов может привести к развитию различных заболеваний, например цинги при недостатке витамина C или рахита при недостатке витамина D. Выяснение ключевой роли витаминов или их биологически активных производных стало одной из главных задач, которые решали биохимики и диетологи с начала нынешнего столетия.

2. Патологическое состояние, известное под названием **фенилкетонурия** (ФКУ), в отсутствие лечения может привести к тяжелой форме умственной отсталости. Биохимическая природа ФКУ известна уже около 30 лет: заболевание обусловлено недостатком или полным отсутствием активности фермента, который катализирует превращение аминокислоты фенилаланина в другую аминокислоту, тирозин. Недостаточная активность этого фермента приводит к тому, что в тканях накапливается избыток фенилаланина и некоторых его метаболитов, в частности кетонов, что неблагоприятно сказывается на развитии центральной нервной системы. После того как были выяснены биохимические основы ФКУ, удалось найти рациональный способ лечения: больным детям назначают диету с пониженным содержанием фенилаланина. Массовое обследование новорожденных на ФКУ позволяет в случае надобности начать лечение незамедлительно.

3. **Кистозный фиброз** — наследуемая болезнь экзокринных, и в частности потовых, желез. Причина болезни неизвестна. Кистозный фиброз является одной из наиболее распространенных генетических болезней в Северной Америке. Он характеризуется аномально вязкими секретами, которые закупоривают секреторные протоки поджелудочной железы и бронхиолы. Страдающие этой болезнью чаще всего погибают в раннем возрасте от легочной инфекции. Поскольку молекулярная основа болезни неизвестна, возможно только симптоматическое лечение. Впрочем, можно надеяться, что в недалеком будущем с помощью технологии рекомбинантных ДНК удастся выяснить молекулярную природу заболевания, что позволит найти более эффективный способ лечения.

ФОРМАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ

Биохимия, как следует из названия (от греческого *bios* — жизнь), — это химия жизни, или, более строго, наука о химических основах процессов жизнедеятельности.

Структурной единицей живых систем является клетка, поэтому можно дать и другое определение: биохимия как наука изучает химические компоненты живых клеток, а также реакции и процессы, в которых они участвуют. Согласно этому определению, биохимия охватывает широкие области **клеточной биологии** и всю **молекулярную биологию**.

ЗАДАЧИ БИОХИМИИ

Главная задача биохимии состоит в том, чтобы достичь полного понимания на молекулярном уровне природы всех химических процессов, связанных с жизнедеятельностью клеток.

Для решения этой задачи необходимо **выделить** из клеток многочисленные соединения, которые там находятся, определить их **структуру** и установить их **функции**. В качестве примера можно указать на многочисленные исследования, направленные на выяснение молекулярных основ **мышечного сокращения** и ряда сходных процессов. В результате были выделены в очищенном виде многие соединения различной степени сложности и проведены детальные структурно-функциональные исследования. В итоге удалось выяснить ряд аспектов молекулярных основ мышечного сокращения.

Еще одна задача биохимии заключается в выяснении вопроса о происхождении жизни. Наши представления об этом захватывающем процессе далеки от исчерпывающих.

ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сфера биохимии столь же широка, как и сама жизнь. Всюду, где существует жизнь, протекают различные химические процессы. Биохимия занимается изучением химических реакций, протекающих в микроорганизмах, растениях, насекомых, рыбах, птицах, низших и высших млекопитающих, и в частности в организме человека. Для студентов, изучающих биомедицинские науки, особый интерес пред-

ставляют два последних раздела. Однако было бы недальновидно совсем не иметь представления о биохимических особенностях некоторых других форм жизни: нередко эти особенности существенны для понимания разного рода ситуаций, имеющих прямое отношение к человеку.

БИОХИМИЯ И МЕДИЦИНА

Между биохимией и медициной имеется широкая двусторонняя связь. Благодаря биохимическим исследованиям удалось ответить на многие вопросы, связанные с развитием заболеваний, а изучение причин и хода развития некоторых заболеваний привело к созданию новых областей биохимии.

Биохимические исследования, направленные на выявление причин заболеваний

В дополнение к указанным выше мы приведем еще четыре примера, иллюстрирующих широту диапазона возможных применений биохимии. 1. Анализ механизма действия токсина, продуцируемого возбудителем холеры, позволил выяснить важные моменты в отношении клинических симптомов болезни (диарея, обезвоживание). 2. У многих африканских растений содержание одной или нескольких незаменимых аминокислот весьма незначительно. Выявление этого факта позволило понять, почему те люди, для которых именно эти растения являются основным источником белка, страдают от белковой недостаточности. 3. Обнаружено, что у комаров — переносчиков возбудителей малярии — могут формироваться биохимические системы, наделяющие их невосприимчивостью к инсектицидам; это важно учитывать при разработке мер по борьбе с малярией. 4. Гренландские эскимосы в больших количествах потребляют рыбий жир, богатый некоторыми полиненасыщенными жирными кислотами; в то же время известно, что для них характерно пониженное содержание холестерола в крови, и поэтому у них гораздо реже развивается атеросклероз. Эти наблюдения навели на мысль о возможности применения полиненасыщенных жирных кислот для снижения содержания холестерола в плазме крови.

Изучение болезней способствует развитию биохимии

Наблюдения английского врача сэра Арчибальда Гаррода еще в начале 1900-х гг. за небольшой группой пациентов, страдавших **врожденными нарушениями метаболизма**, стимулировали исследование биохимических путей, нарушение которых происходит при такого рода состояниях. Попытки понять природу генетического заболевания под названием **семейная гиперхолестеролемия**, приводящего к развитию тяжелого атеросклероза в раннем возрасте, способствовали быстрому накоплению сведений о клеточных рецепторах и о механизмах поглощения холестерола клетками. Интенсивное изучение онкогенов в **раковых клетках** привлекло внимание к молекулярным механизмам контроля роста клеток.

Изучение низших организмов и вирусов

Ценная информация, которая оказалась весьма полезной для проведения биохимических исследований в клинике, была получена при изучении некоторых низших организмов и вирусов. Например, современные теории **регуляции активности генов и ферментов** сформировались на базе пионерских исследований, выполненных на плесневых грибах и на бактериях. Технология **рекомбинантных ДНК** зародилась в ходе исследований, проведенных на бактериях и бактериальных вирусах. Главным достоинством бактерий и вирусов как объектов биохимических исследований является **высокая скорость их размножения**; это существенно облегчает проведение **генетического** анализа и генетических манипуляций. Сведения, полученные при изучении вирусных генов, ответственных за развитие некоторых форм рака у животных (**вирусных онкогенов**), позволили лучше понять механизм трансформации нормальных клеток человека в раковые.

БИОХИМИЯ И ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Биохимия нуклеиновых кислот лежит в самой основе **генетики**; в свою очередь использование генетических подходов оказалось плодотворным для многих областей биохимии. **Физиология**, наука о функционировании организма, очень сильно перекрывается с биохимией. В **иммунологии** находит применение большое число биохимических методов, и в свою очередь многие иммунологические подходы широко используются биохимиками. **Фармакология** и **фармация** базируются на биохимии и физиологии; метаболизм большинства лекарств осуществляется в результате соответствующих ферментативных реакций. Яды влияют на биохимические реакции или процессы; эти вопросы составляют предмет **токсикологии**. Как мы уже говорили, в основе разных видов патологии лежит нарушение ряда химических процессов. Это обусловливает все более широкое использование биохимических подходов для изучения различных видов **патологии** (например, воспалительные процессы, повреждения клеток и рак). Многие из тех, кто занимается **зоологией** и **ботаникой**, широко используют в своей работе биохимические подходы. Эти взаимосвязи не удивительны, поскольку, как мы знаем, жизнь во всех своих проявлениях зависит от разнообразных биохимических реакций и процессов. Барьеры, существовавшие ранее между биологическими науками, фактически разрушены, и биохимия все в большей степени становится их общим языком.

Глава 2

Биомолекулы и биохимические методы

Роберт Марри

ВВЕДЕНИЕ

Эта глава состоит из пяти основных разделов. В первом разделе рассматриваются **состав организма и основные классы молекул**, из которых он построен. Об этих молекулах будет идти речь на протяжении всей книги.

Основной структурной и функциональной единицей биологических систем является клетка. Именно в клетках протекает большинство химических реакций. Поэтому во втором разделе приведена краткая характеристика **компонентов клетки** и способов их выделения; значительная часть этой книги будет посвящена детальному описанию функций этих компонентов.

Задача третьего раздела вытекает из того обстоятельства, что биохимия является **экспериментальной наукой**. Очень важно понимать и уметь оценивать различные экспериментальные подходы и методы, используемые в биохимии, чтобы ее изучение не свелось к простому зазубриванию. Кроме того, биохимия — это не застывший свод непреложных знаний, а постоянно развивающаяся наука. Как и в других областях биомедицинских знаний, ее успехи в значительной степени зависят от новых экспериментальных подходов и прогресса в технологии.

В четвертом разделе кратко суммированы **достижения** биохимии. Общий взгляд на всю эту науку в целом позволит читателю лучше ориентироваться в представленном материале.

Наконец, задача пятого раздела — показать, **насколько ограничены наши знания во многих областях биохимии**; это, в частности, касается процессов развития организма, дифференцировки тканей, функционирования мозга, причин возникновения рака и других болезней человека. Возможно, это обстоятельство возбудит у читателей желание внести свою лепту в развитие упомянутых областей исследования.

Таблица 2.1. Приблизительный элементный состав организма человека (в процентах к сухому весу) [1]

Элемент	%	Элемент	%
Углерод	50	Калий	1
Кислород	20	Сера	0,8
Водород	10	Натрий	0,4
Азот	8,5	Хлор	0,4
Кальций	4	Магний	0,1
Фосфор	2,5	Железо	0,01
		Марганец	0,001
		Иод	0,00005

[1] Из работы West E. S., Todd W. R.: Textbook of Biochemistry, 3rd ed. Macmillan, 1961, с любезного разрешения.

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Примерный элементный состав организма человека представлен в табл. 2.1. Большинство биомолекул состоят в основном из **углерода, кислорода, водорода и азота**. Важным компонентом нуклеиновых кислот и других молекул является **фосфат**; в ионизированной форме он широко представлен в организме человека. Ключевую роль в многочисленных биологических процессах играет **кальций**; этот вопрос находится в центре внимания многих современных исследований. Элементы, перечисленные в третьем столбце таблицы, выполняют множество различных функций. Со многими из них приходится почти ежедневно сталкиваться в медицинской практике, например в тех случаях, когда у больных нарушен баланс электролитов (K^+, Na^+, Cl^- и Mg^{2+}), наблюдается анемия, связанная с недостатком железа (Fe^{2+}), или заболевания щитовидной железы (I^-).

ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ ПРИРОДНЫХ БИОМОЛЕКУЛ

Как видно из табл. 2.2, основными **сложными биомолекулами**, присутствующими в клетках и тканях высших животных (включая человека), являются **ДНК, РНК, белки, полисахариды** и **липиды**. Эти сложные молекулы построены из простых биомолекул, которые также перечислены в таблице. Строительными блоками ДНК и РНК (вместе они известны как нуклеиновые кислоты) служат **дезоксирибонуклеоти-**

Таблица 2.2. Основные сложные органические биомолекулы, присутствующие в клетках и тканях. Нуклеиновые кислоты, белки и полисахариды являются полимерами, которые построены из блоков, также указанных в таблице. Липиды, вообще говоря, не являются биополимерами, и не во всех случаях в качестве их строительных блоков используются жирные кислоты

Биомолекулы	Строительные блоки	Главные функции
ДНК	Дезоксирибонуклеотиды	Генетический материал
РНК	Рибонуклеотиды	Матрица для синтеза белков
Белки	Аминокислоты	Весьма разнообразные; обеспечивают функционирование клетки (ферменты, сократительные элементы)
Полисахариды (гликоген)	Глюкоза	Кратковременное запасание энергии (в форме глюкозы)
Липиды	Жирные кислоты	Компоненты мембран; запасают энергию на длительное время (в виде триацилглицеролов)

ды и **рибонуклеотиды** соответственно. Строительными блоками белков являются **аминокислоты**. Полисахариды построены из простых углеводов; в частности, **гликоген** (главный полисахарид, присутствующий в тканях человека) построен из **глюкозы**. Строительными блоками липидов можно считать **жирные кислоты**, хотя липиды и не являются полимерами жирных кислот. ДНК, РНК, белки и полисахариды называют **биополимерами**, поскольку они состоят из повторяющихся строительных блоков (мономеров). Эти сложные молекулы составляют существенную часть «вещества жизни»; большая часть этой книги будет в основном посвящена описанию различных свойств биомолекул — как биополимеров, так и мономеров. Подобного же типа сложные молекулы присутствуют и в низших организмах, хотя их строительные блоки в некоторых случаях, как это видно из табл. 2.2, могут быть несколько иными. Например, бактерии не содержат гликоген и триацилглицеролы, зато содержат другие полисахариды и липиды.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Мы уже привели элементный состав организма человека. Его химический состав представлен в табл. 2.3. Основными компонентами являются **белки, жиры, углеводы, вода** и **минеральные вещества**; при этом наибольшая часть приходится на долю воды, хотя ее содержание в разных тканях существенно различается. Вода — это полярное соединение, способное образовывать водородные связи; именно благодаря этим своим свойствам она является идеальным растворителем в организме человека.

Таблица 2.3. Нормальный химический состав организма человека весом 65 кг [1]

Компоненты	Масса, кг	Содержание, %
Белки	11	17,0
Жиры	9	13,8
Углеводы	1	1,5
Вода [2]	40	61,6
Минеральные вещества	4	6,1

[1] Из работы Davidson S. D., Passmore R., Brock J. F.: Human Nutrition and Dietetics, 5th ed. Churchill Livingstone, 1973, с разрешения.

[2] Содержание воды в разных тканях существенно различается: в ткани кости, не содержащей костного мозга, на ее долю приходится 22,5%. Содержание воды снижается также при накоплении жира.

КЛЕТКА

Шлейден и Шванн, а также другие пионеры науки XIX в., в частности Вирхов, считали клетку фундаментальной единицей биологической активности. Однако сразу же после окончания второй мировой войны произошли три события, ознаменовавшие собой начало периода раздельного развития биохимии и клеточной биологии. Это: 1) широкое распространение **электронных микроскопов**; 2) разработка методов **разрушения клеток** в сравнительно мягких условиях, позволяющих сохранить функции их компонентов; 3) широкое распространение высокоскоростных **ультрацентрифуг** с охлаждением, с помощью которых можно было создавать центробежные силы, достаточные для разделения компонентов разрушенных клеток, и избегать их перегрева. С помощью электронной микроскопии было выявлено множество ранее неизвестных или плохо различимых клеточных компонентов, а разрушение клеток и ультрацентрифугирование позволили разделить их и провести исследование in vitro.

Клетка печени крысы

На рис. 2.1 схематически изображена клетка печени крысы (гепатоцит). Биохимические свойства этих клеток изучены наиболее подробно — частично из-за того, что клетки печени удается получать в относительно больших количествах, а частично благодаря тому, что они удобны для фракционирования и выполняют множество функций. Гепатоцит содержит все

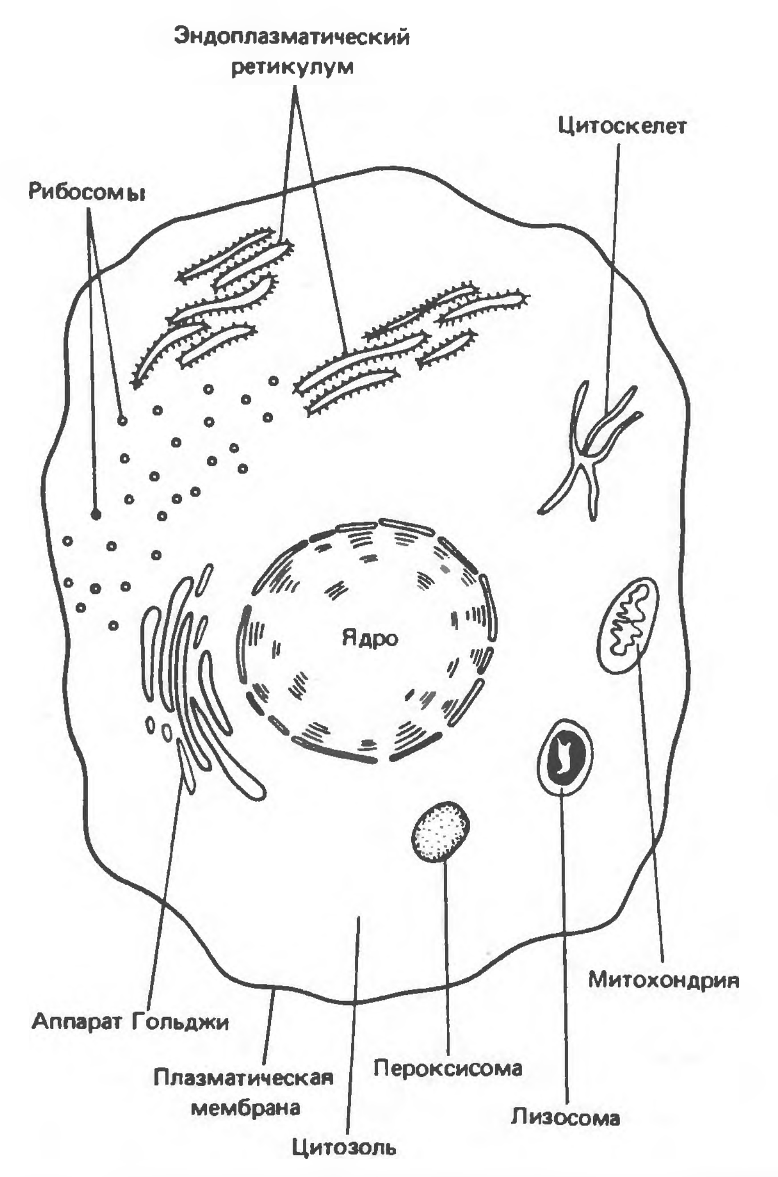


Рис. 2.1. Схематическое изображение клетки печени крысы, на котором показаны основные клеточные органеллы.

основные типы органелл, присутствующих в клетках эукариот (табл. 2.4),—ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, свободные рибосомы, аппарат Гольджи, лизосомы, пероксисомы, плазматическую мембрану и элементы цитоскелета.

Субклеточное фракционирование

Для глубокого изучения функций любой из органелл необходимо прежде всего получить эти органеллы в относительно чистом виде, так, чтобы их препарат был как можно меньше загрязнен другими органеллами. Процесс, с помощью которого этого обычно удается достичь, называется субклеточным фракционированием и состоит из трех этапов: экстракции, гомогенизации и центрифугирования. Большинство первых работ в этой области выполнено на печени крысы.

А. Экстракция. Первым шагом при выделении специфических органелл (или молекул) является их экстрагирование из клеток, в которых они находятся. Большинство органелл и многие биомолекулы (в частности, белки) весьма **лабильны** (неустойчивы) и легко утрачивают биологическую активность. Поэтому их нужно экстрагировать в **мягких условиях** (в водных растворах, избегая экстремальных значений pH, осмотического давления, а также высоких температур). Бо́льшая часть операций по выделению органелл производится при 0—4° С (в холодной комнате или на льду). При комнатной температуре может наблюдаться значительное уменьшение активности, частично вследствие действия различных гидролитических ферментов (протеаз, нуклеаз и т. д.), высвобождающихся при разрушении клеток. Обычно для экстракции органелл используют 0,25 М раствор сахарозы (изоосмотический раствор), содержащий ионы K^+ и Mg^{2+} в концентрации, близкой к физиологической; pH раствора доведен до 7,4 солянокислым трис-буфером (трис [гидроксиметил]-аминометангидрохлорид) в концентрации 0,05 М. Этот раствор часто называют СТКМ. Не все растворители обеспечивают столь же мягкие условия экстракции, как СТКМ; например, для экстракции липидов и углеводов используют **органические растворители**.

Б. Гомогенизация. Для выделения органелл (или биомолекул) из клеток необходимо прежде всего разрушить клетки в мягких условиях. Удобным методом разрушения органов (печени, почки, мозга) и составляющих их клеток является гомогенизация. Для этого измельченные фрагменты соответствующего органа помещают в стеклянный стаканчик подходящих размеров, заполненный раствором для гомогенизации (например, СТКМ), а затем пестиком (вручную или с помощью моторчика) приводят смесь во вращение. Вращение пестика с контролируемой скоростью создает силы вязкого трения, под действием которых клетки разрушаются и их содержимое высвобождается в раствор сахарозы. Полученную суспензию, содержащую многие интактные (неповрежденные) органеллы, называют **гомогенатом**.

В. Центрифугирование. Субфракционирование гомогената путем дифференциального центрифугирования — это один из наиболее важных методов биохимии. В классическом случае используются три стадии центрифугирования при возрастающих скоростях (рис. 2.2). В ходе каждой из них образуются осадок и надосадочная жидкость (супернатант). Супернатант, полученный на каждой из стадий, подвергается центрифугированию на следующей стадии. В результате этой процедуры образуются три типа осадков, которые называют ядерной, митохондриальной и микросомной фракциями. Ни одна из этих фракций не представляет собой абсолютно чистые органеллы. Однако с помощью электронного микроскопа, а также путем идентификации соответствующих «маркерных» ферментов и химических компонентов (например, ДНК или РНК) было установлено, что

Таблица 2.4. Основные клеточные органеллы и их функции. Перечислены только главные функции каждого типа органелл. В ряде случаев в этих органеллах могут протекать и другие процессы и реакции, функционировать другие метаболические пути

Органелла или фракция [1]	Маркер	Основные функции
Ядро	ДНК	Область локализации хромосом Область ДНК-зависимого синтеза РНК (**транскрипция**)
Митохондрия	Глутаматдегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты, синтез ATP
Рибосома [1]	Высокое содержание РНК	Синтез белка (**трансляция** мРНК)
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза	Связанные с мембранами рибосомы являются главным местом синтеза белка Синтез различных липидов Окисление многих ксенобиотиков (цитохромом *P*-450)
Лизосома	Кислая фосфатаза	Место действия многих гидролаз (ферментов, катализирующих реакции гидролитического расщепления)
Плазматическая мембрана	Na/K^+-ATPаза 5′-нуклеотидаза	Транспорт молекул в клетку и из клетки, межклеточная адгезия и межклеточные коммуникации
Аппарат Гольджи	Галактозилтрансфераза	Внутриклеточная «сортировка» белков Реакции гликозилирования Реакции сульфатирования
Пероксисома	Каталаза Оксидаза мочевой кислоты	Деградация некоторых жирных кислот и аминокислот Образование и разложение перекиси водорода
Цитоскелет [1]	Специфические ферменты-маркеры [2] отсутствуют	Опорные функции (микрофиламенты, микротрубочки, промежуточные филаменты)
Цитозоль [1]	Лактат-дегидрогеназа	Процесс гликолиза, синтез жирных кислот

[1] Органеллу можно определить как ограниченную мембраной субклеточную структуру, которую можно выделить при высокоскоростном центрифугировании. Согласно этому определению, рибосомы, цитоскелет и цитозоль не являются органеллами. Однако в этой таблице они перечислены вместе с органеллами, поскольку их тоже обычно выделяют путем центрифугирования. Их можно рассматривать как субклеточные образования или фракции. Препарат органелл, выделенных в ходе одного цикла дифференциального центрифугирования, редко бывает чистым; чтобы получить чистую фракцию, обычно приходится центрифугировать препарат по меньшей мере несколько раз.

[2] Фракция цитоскелета идентифицируется с помощью электронной микроскопии или путем электрофоретического анализа на содержание специфичных для этой фракции белков.

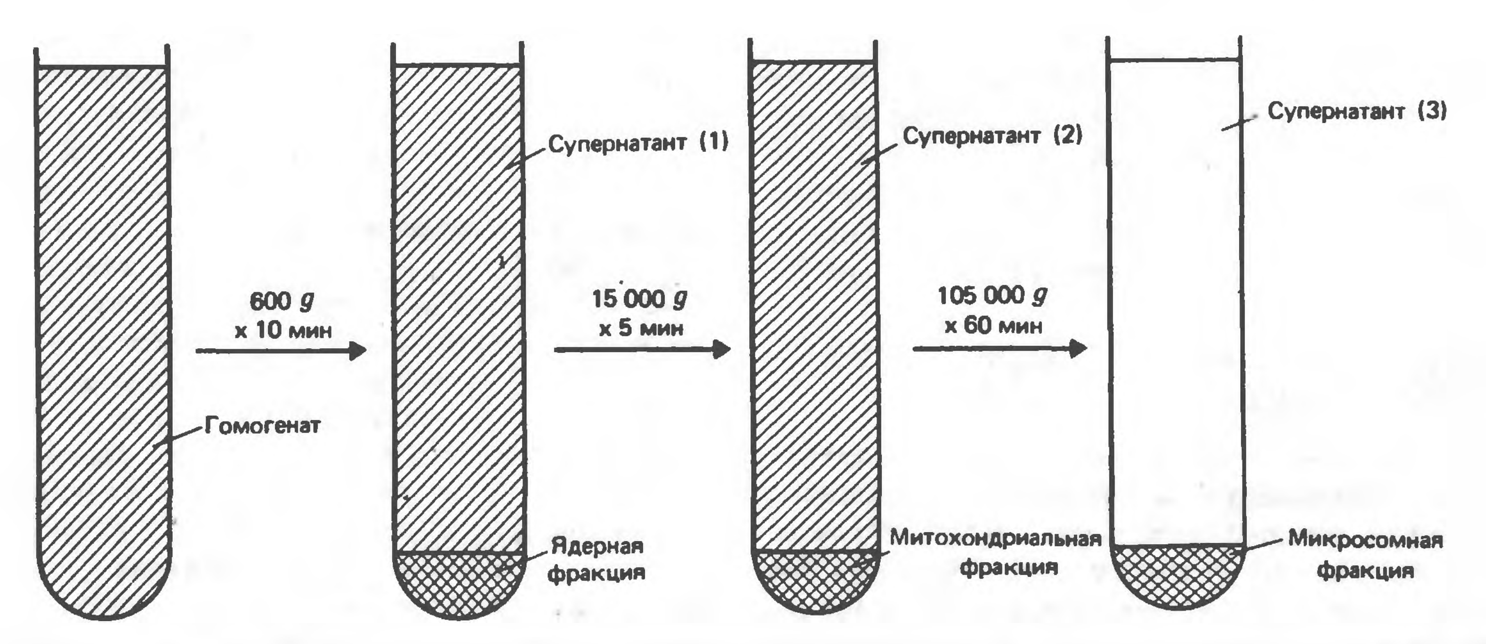


Рис. 2.2. Схема разделения субклеточных фракций с помощью дифференциального центрифугирования. Гомогенизированную ткань (например, печень) сначала центрифугируют при малой скорости, что приводит к осаждению ядерной фракции (содержащей ядро и неразрушенные клетки) и отделению супернатанта (1). Супернатант осторожно сливают (декантируют) и проводят центрифугирование при более высокой скорости, в результате чего разделяются митохондриальная фракция (содержащая митохондрии, лизосомы и пероксисомы) и супернатант (2). Последний декантируют и центрифугируют при высокой скорости, в результате чего формируется микросомная фракция (содержащая смесь свободных рибосом и фрагментов гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума) и отделяется чистый прозрачный раствор — конечный супернатант (3). Последний представляет собой цитозоль, или клеточный сок. Используя различные модификации представленного здесь подхода, обычно выделяют каждую из клеточных органелл в относительно чистом виде.

главными компонентами этих трех фракций являются ядра, митохондрии и микросомы соответственно. «Маркерный» фермент или химическое соединение — это тот компонент, который присутствует практически только в составе данного типа органелл; например, кислая фосфатаза находится в лизосомах, а ДНК — в ядре (табл. 2.4). Таким образом, маркер служит индикатором присутствия или отсутствия фракции тех органелл, в составе которых он находится. **Микросомная фракция (микросомы)** представляет собой в основном смесь фрагментов гладкого эндоплазматического ретикулума, шероховатого эндоплазматического ретикулума (т. е. эндоплазматического ретикулума с присоединенными к нему рибосомами) и свободных рибосом. Содержимое супернатанта, полученного на конечной стадии, приблизительно соответствует составу **клеточного сока (цитозоля)**. Модификации этого основного подхода, основанные на использовании различных сред для гомогенизации, разных условий или методов центрифугирования (например, использование непрерывного или ступенчатого градиента сахарозы), позволили выделить в более или менее чистом виде все органеллы, показанные на рис. 2.1 и перечисленные в табл. 2.4. Описанная выше схема применима к большинству органов и клеток, однако в каждом случае для стандартизации процедуры субклеточного фракционирования необходимо провести серию анализов на содержание маркерных ферментов или других химических компонентов, а также выполнить электронно-микроскопические наблюдения.

Значение субклеточного фракционирования для развития биохимии и клеточной биологии невозможно переоценить. Оно составляет одно из главных звеньев общего экспериментального подхода (см. ниже), с помощью которого удалось выяснить функции органелл, перечисленные в табл. 2.4. Получение этой информации представляет одно из главных достижений биохимических исследований (см. ниже).

ОБЩИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОД, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В БИОХИМИИ

Этот подход состоит из трех составных частей: 1) **выделение биомолекул и органелл**, находящихся в клетке (см. предыдущий раздел о субклеточном фракционировании); 2) **определение структуры биомолекул**; 3) **использование различных препаратов для анализа функций биомолекул и их метаболизма** (т.е. процессов синтеза и распада).

1. Выделение биомолекул. Как и в случае органелл, для выяснения функции любой биомолекулы необходимо прежде всего получить ее в чистом виде. В табл. 2.5 перечислены основные методы, используемые для разделения и очистки биомолекул. Здесь мы не будем подробно обсуждать их: некоторые из них будут вкратце описаны в других частях книги.

Таблица 2.5. Основные методы разделения и очистки биомолекул. Бо́льшая часть этих методов пригодна для анализа компонентов, находящихся в клеточных экстрактах и других биохимических препаратах. Для получения большинства биомолекул в чистом виде, как правило, необходимо последовательно использовать несколько методов. Подробности о применении каждого из методов читатель может найти в соответствующих руководствах

Фракционирование солями (например, осаждение с сульфатом аммония)
Хроматография
- Бумажная
- Ионообменная (анионо- и катионообменная)
- Аффинная
- Тонкослойная
- Газо-жидкостная
- Жидкостная под высоким давлением

Гель-фильтрация
Электрофорез
- На бумаге
- Высоковольтный
- В агарозе
- В ацетатцеллюлозе
- В крахмальном геле
- В полиакриламиде
- В полиакриламиде в присутствии додецилсульфата натрия

Ультрацентрифугирование

Почти всегда очистить биомолекулы до состояния **гомогенности** (т. е. до отсутствия загрязнения любыми другими биомолекулами) удается лишь при последовательном применении нескольких таких методов.

Важно иметь в виду, что прогресс в биохимии зависит от разработки новых методов анализа, очистки и определения структуры. Например, в области биохимии липидов произошел настоящий переворот после введения в практику **газо-жидкостной** и **тонкослойной хроматографии**. Анализ мембранных и многих других белков был крайне затруднен до тех пор, пока не появился метод **электрофореза в полиакриламидном геле** в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПЭГ): применение додецилсульфата натрия приводит к «солюбилизации» (растворению) ряда белков, которые ранее не удавалось перевести в растворимое состояние. После такой солюбилизации уже можно проводить электрофорез. Разработка методов **клонирования** и **секвенирования** (определения последовательности мономеров) ДНК произвела подлинную революцию в изучении нуклеиновых кислот и вообще в биологии.

2. Определение структуры биомолекул. После очистки биомолекул можно определить их структуру. Это — совершенно необходимое условие успешного детального изучения корреляции между структурой и функцией. Основные методы, используемые для анализа структуры биомолекул, перечислены в табл. 2.6. Они должны быть знакомы читателям,

Таблица 2.6. Основные методы определения структуры биомолекул

Элементный анализ
Спектроскопия в Уф-, видимой и инфракрасной областях, ЯМР-спектроскопия
Использование кислотного или щелочного гидролиза для расщепления изучаемых молекул на составляющие компоненты
Использование набора ферментов с известной специфичностью для расщепления изучаемых молекул (например, использование протеаз, нуклеаз, гликозидаз)
Масс-спектрометрия
Специфические методы секвенирования (например, белков или нуклеиновых кислот)
Рентгеновская кристаллография

изучавшим органическую химию. Специфичность действия ряда ферментов позволяет использовать их в качестве мощных инструментов для выяснения структурных особенностей некоторых биомолекул. Теоретический и технический прогресс, позволивший повысить разрешающую способность **масс-спектрометрии** и **ЯМР-спектроскопии**, способствовал тому, что эти методы стали широко использоваться для определения структуры молекул. Например, крайне сложную структуру углеводных цепей, входящих в состав некоторых биомолекул, в частности гликопротеинов, во многих случаях удалось установить с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Наиболее детальную информацию о структуре биомолекул дают методы рентгеновской кристаллографии. Именно благодаря их использованию была установлена детальная структура различных белков и ферментов, а также открыта двойная спираль ДНК.

3. Изучение функций и метаболизма биомолекул с использованием различных препаратов. Первые биохимические исследования человека и животных проводились на уровне целого организма. В качестве примера можно привести изучение дыхания и судьбы поступающих в организм соединений. Вскоре стало ясно, однако, что целый организм слишком сложен, чтобы можно было получить четкие ответы на различные вопросы. Многие проблемы, возникавшие при работе на целом организме, были устранены после приготовления более простых препаратов и изучения их in vitro. В табл. 2.7 приведены различные типы препаратов, которые используются в настоящее время для изучения биохимических процессов; большинство сведений, содержащихся в этой книге, получено именно на таких препаратах. В таблице препараты перечислены в порядке уменьшения их сложности. Однако использование более простых препаратов тоже имеет свои ограничения. Резу-

Таблица 2.7. Иерархическая последовательность препаратов, используемых для изучения биохимических процессов

Метод	Комментарии
Исследования на уровне целого организма	Они могут включать 1) удаление органа (например, гепатэктомия) 2) изменение диеты (голодание — усиленное питание) 3) прием лекарств (например, фенобарбитала) 4) введение токсических веществ (например, четыреххлористого углерода) 5) наблюдение за животным со специфическими заболеваниями (например, сахарным диабетом) 6) использование сложных методов, таких, как ЯМР-спектроскопия и позитронно-эмиссионная томография
Исследование изолированного перфузируемого органа	Наиболее пригодны сердце, печень, почки
Использование тканевых срезов	Особенно срезы печени
Использование целых клеток	1. Особенно это относится к клеткам крови, которые относительно легко поддаются выделению 2. Клетки в культурах тканей являются незаменимым объектом во многих областях биологии
Использование гомогената	1. Позволяет работать с бесклеточными препаратами 2. Можно добавлять или удалять (путем диализа) различные соединения и наблюдать за последствиями 3. Путем центрифугирования можно провести дальнейшее субфракционирование, что позволяет получить индивидуальные клеточные органеллы
Исследование изолированных клеточных органелл	Широко используется для изучения функций митохондрий, эндоплазматического ретикулума, рибосом и т. д.
Субфракционирование органелл	Широко используется, например, при изучении функций митохондрий
Выделение и характеристика метаболитов и ферментов	Важнейшая часть анализа любой химической реакции или метаболического пути
Клонирование генов, кодирующих ферменты и другие белки	Выделение клонированного гена необходимо для изучения деталей его структуры и регуляции; позволяет установить аминокислотную последовательность белка, который им кодируется

льтаты экспериментов in vitro могут оказаться ошибочными, например в том случае, когда при гомогенизации клеток высвобождаются ферменты, частично разрушающие исследуемые соединения.

Общая стратегия изучения биохимических процессов

В этой книге основное внимание уделено сложным биохимическим процессам (например, синтезу белков, мышечному сокращению), в том числе и различным метаболическим путям. **Метаболический путь** — это совокупность реакций, ответственных за **синтез** сложных соединений из более простых и за **распад** соединения до конечных продуктов. Тот или иной сложный биохимический процесс или метаболический путь иногда проявляется на уровне целого организма. Примером такого рода может служить сокращение мышц. Мы знаем, что глюкоза является источником энергии для человека и других животных, а это означает, что в организме человека она должна распадаться (подвергаться метаболизму) с выделением энергии. Однако для того, чтобы получить полное представление о том, каким образом происходит метаболизм глюкозы в клетке — а мы такого представления (в частности, о механизме регуляции) пока не имеем,— необходимо провести исследования на других уровнях. На рис. 2.3 представлены различные типы наблюдений и анализа, которые позволяют полностью охватить весь биохимический процесс, такой, например, как распад глюкозы и высвобождение энергии (этот процесс известен как **гликолиз**). Эта схема в общих чертах применима ко всем основным биохимическим процессам, обсуждаемым в этой книге, и, таким образом, иллюстрирует общую стратегию изучения биохимических процессов; об этом следует помнить, рассматривая любой биохимический процесс (гликолиз, окисление жирных кислот и т. д.).

Дополнительные замечания по препаративной работе и стратегии исследования

Полезно сделать еще несколько замечаний по некоторым позициям, указанным в табл. 2.7 и на рис. 2.3. 1. Возможность артефактов нисколько не снимает абсолютной необходимости **выделения** и **идентификации** каждого компонента, участвующего в биохимическом процессе, в чистом виде; без этого невозможно понять, как протекает процесс на молекулярном уровне. Подтверждением этому могут служить многочисленные примеры, которые нам встретятся в дальнейшем. 2. Важно научиться **реконструировать** процесс in vitro путем систематического подбора индивидуальных компонентов. Если после сборки всех компонентов системы процесс все-таки не идет, это может означать отсутствие какого-то важного компонента, который был пропущен при идентификации и не добавлялся при сборке. 3. Благодаря достигнутым в последние годы успехам в области технологии (например, в ЯМР-спектроскопии и позитронно-эмиссионной томографии) появилась возможность выявлять определенные биомолекулы на уровне обследования целых органов и следить за изменением их содержания во времени. Это позволяет анализировать многие сложные биохимические процессы in vivo. 4. Лишь после того, как наблюдения, выполненные на разных уровнях, дадут согласующиеся между собой результаты, можно с уверенностью говорить о реальных успехах в понимании изучаемого биохимического процесса. Если же при использовании разных подходов возникнут существенные расхождения, следует искать причину этих расхождений до тех пор, пока не будет найдено рациональное объяснение. 5. Описанное выше сочетание разных уровней исследования и разного рода препаратов может использоваться для выявления биохимических изменений у животных, связанных с **изменениями метаболизма** (например, при ограниченном или усиленном питании) или

Вывод о существовании биохимического процесса или метаболического пути, сделанный на основании наблюдений над целым организмом
↓
Анализ механизмов, контролирующих процесс in vivo
↓
Анализ нарушений процесса, вызванных специфическими болезнями (врожденные ошибки метаболизма, рак и т. д.).
↓
Локализация процесса в одном или нескольких органах
↓
Локализация процесса в одной или нескольких клеточных органеллах или субклеточных фракциях
↓
Рассмотрение процесса в виде отдельных реакций
↓
Очистка его индивидуальных субстратов, продуктов, ферментов, кофакторов и других компонентов
↓
Анализ механизмов, контролирующих процесс in vitro
↓
Изучение механизмов отдельных реакций
↓
Реконструкция процесса
↓
Изучение процесса на генетическом уровне методом рекомбинантных ДНК

Рис. 2.3. Стратегия изучения метаболического процесса или метаболического пути. Используемая процедура не обязательно должна включать все перечисленные здесь этапы. Однако применение именно этих подходов позволяет обычно выяснить детали биохимических процессов или метаболических путей. Эта схема в общем виде использовалась для изучения главных метаболических путей, рассматриваемых в последующих главах.

с **определенными заболеваниями** (сахарный диабет, рак). 6. Бóльшая часть описанных выше методов и подходов применима для изучения клеток или тканей человека в норме и патологии. При этом необходимо тщательно следить за тем, чтобы использовались только свежеприготовленные препараты, а кроме того, следует обращать особое внимание на этические вопросы, связанные с проведением экспериментов на человеке.

Использование изотопов в биохимии

Очень большую роль сыграло введение в биохимическую практику изотопов в 1930-х гг. Ранее было очень трудно пометить биомолекулы, чтобы затем следить за их превращениями в ходе метаболизма. В пионерских исследованиях, прежде всего Шонхеймера и его коллег, для решения многих биохимических задач использовались стабильные изотопы (^{2}D, ^{15}N), за судьбой которых далее следили с помощью масс-спектрометрии. Например, синтезировали определенные аминокислоты, сахара и жирные кислоты, в состав которых вводили стабильные изотопы, а затем добавляли эти соединения в пищу животным или к препаратам in vitro, чтобы можно было следить за их метаболизмом (определять время полужизни, превращение в другие биомолекулы и т. д.). Именно таким способом были выяснены многие аспекты метаболизма белков, углеводов и липидов. Стало ясно, что метаболизм — очень активный процесс: большая часть соединений в клетке постоянно синтезируется и распадается, хотя скорости этих процессов могут сильно различаться. Суммирование всех этих результатов позволило Шонхеймеру сформулировать представление о «динамической природе метаболизма».

Очень важное значение имело последующее использование **радиоактивных изотопов** и приборов, позволяющих определять их количество. Стабильные и радиоактивные изотопы, широко используемые при работе с биологическими системами, перечислены в табл. 2.8. Их применение сыграло решающую роль в развитии ряда областей биохимии. Многие исследования простых и сложных биомолекул in vivo и in vitro в значительной мере опираются именно на использование изотопов. Тот прогресс, который был достигнут в последнее время в секвенировании нуклеиновых кислот и в развитии радиоиммунных методов для измерения очень малых количеств соединений в биологических системах, также был обусловлен в значительной степени применением изотопов.

Таблица 2.8. Изотопы, наиболее широко используемые в биохимических исследованиях

Стабильные изотопы	Радиоактивные изотопы
^{2}D	^{3}H
^{15}N	^{14}C
^{18}O	^{32}P
	^{35}S
	^{35}Ca
	^{125}I
	^{131}I

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ БИОХИМИИ

Суммируем основные достижения в области биохимии, в особенности в биохимии человека.

- Определен химический состав клеток, тканей и целого организма. Выделены основные соединения, присутствующие в этих системах, и установлена их структура.
- Выяснены — по крайней мере в общих чертах — функции многих простых биомолекул. Установлены также функции наиболее важных сложных биомолекул. Центральное место среди всех этих открытий принадлежит установлению того факта, что ДНК — это генетический материал и содержащаяся в нем информация передается от нее одному из видов РНК (информационной РНК), которая в свою очередь определяет последовательность аминокислот в белках. Поток информации, исходно заключенной в ДНК, удобно представить в виде схемы ДНК→РНК→Белок.
- Выделены главные органеллы животных клеток, установлены их основные функции.
- Показано, что почти все реакции, протекающие в клетках, катализируются ферментами; многие ферменты получены в чистом виде и изучены, выявлены общие принципы механизмов их действия.
- Прослежены метаболические пути синтеза и распада главных простых и сложных биомолекул. Показано, что пути синтеза данного соединения в общем случае отличаются от путей его распада.
- Выяснены многие аспекты регуляции метаболизма.
- В общих чертах установлено, каким образом клетки запасают и используют энергию.
- Выяснены основные особенности строения и функции различных мембран, показано, что основными их компонентами являются белки и липиды.
- Накоплено значительное количество данных о механизме действия главных гормонов.
- Установлены биохимические основы значительного числа заболеваний.

КАК МАЛО МЫ ЗНАЕМ

Нисколько не умаляя значения того огромного количества биохимических данных, которое накоплено к настоящему времени, очень важно уяснить, как скудны наши знания во многих областях биохимии. Среди тех проблем, которые еще предстоит решить, пожалуй, наиболее важны две: выяснение

биохимических основ **индивидуального развития и дифференцировки** и **функций мозга.** Хотя химическая природа генетического материала детально изучена, о механизме включения и выключения генов в процессе развития организма мы не знаем почти ничего. Выяснение механизма **регуляции генов** совершенно необходимо для изучения процессов дифференцировки клеток и превращения нормальных клеток в раковые. Сейчас о **делении и росте клеток** — нормальных и опухолевых — и о регуляции этих процессов мы знаем крайне мало. Практически ничего не известно о биохимической основе **сложных процессов нервной деятельности**, включая такие явления, как сознание и память. Весьма ограниченны сведения о механизмах **клеточной секреции.** Несмотря на определенный прогресс, неизвестна молекулярная природа **многих распространенных генетических болезней**; впрочем, можно надеяться, что в ближайшие несколько лет благодаря развитию техники рекомбинантных ДНК здесь будут достигнуты заметные успехи. К началу следующего века, а возможно, и раньше, будет определена нуклеотидная последовательность всего генома человека; правда, остаются сомнения, является ли этот подход оптимальным с точки зрения использования человеческих и финансовых ресурсов.

ЛИТЕРАТУРА

Freifelder D. Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology, Freeman, 1982.

Fruton J. S. Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology, Wiley-Interscience, 1972.

Weinberg R. A. The molecules of life, Sci. Am. (Oct.), 1985, **253**, 48. (Интересны и все другие статьи этого номера журнала.)

Раздел I
Структура и функции белков и ферментов

Глава 3

Аминокислоты

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

В живых клетках синтезируется множество **макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов)**, которые играют роль структурных компонентов, биокатализаторов, гормонов, рецепторов или хранилищ генетической информации. Эти макромолекулы представляют собой **биополимеры**, построенные из **мономерных единиц**, или **строительных блоков.** В нуклеиновых кислотах мономерными единицами служат **нуклеотиды**, в сложных полисахаридах—**сахара** и их производные, в белках—L-α-**аминокислоты**.

Белки помимо аминокислот могут содержать и другие компоненты, однако трехмерная структура белков, а следовательно, и их биологические свойства определяются в основном **аминокислотным составом, порядком чередования аминокислот** в полипептидной цепи и как следствие их **взаимным пространственным расположением.**

Аминокислоты в клетках выполняют множество важных функций; некоторые из биологически важных соединений, образующихся из аминокислот, приведены в табл. 3.4 и 3.5.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аминокислоты, являясь строительными блоками пептидов и белков, выполняют и ряд других важных функций. Некоторые из них, по-видимому, участвуют в передаче нервных импульсов; примерами служат глицин и глутаминовая кислота. В пище должны содержаться незаменимые аминокислоты, поскольку организм человека не способен синтезировать их в количествах, достаточных для роста (в детстве) и поддержания здоровья (во взрослом состоянии). В результате метаболизма аминокислот образуются многие соединения, имеющие биомедицинское значение. Например, при декарбоксилировании некоторых аминокислот образуются соответствующие амины, и некоторые из них [гистамин, γ-аминомасляная кислота (ГАМК)] выполняют важные биологические функции. Ряд заболеваний связан с нарушениями транспорта аминокислот внутрь клеток. Эти заболевания часто сопровождаются значительным повышением содержания одной или нескольких аминокислот в моче; такое состояние называют аминоацидурией.

АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты содержат в качестве функциональных групп аминогруппу и карбоксильную группу. В α-аминокислотах обе они связаны с одним и тем же (α) углеродным атомом (рис. 3.1).

В природе существует около 300 аминокислот, однако в белках обнаружены только 20 из них. В результате полного гидролиза[1] белков высвобождается 20 L-α-аминокислот (табл. 3.2). Одни и те же 20 аминокислот присутствуют в белковых молекулах всех форм жизни—растений, животных и микроорганизмов. Почему это так—мы поймем позже, когда будем обсуждать универсальную природу генетического кода (гл. 30). Однако в ряде белков встречаются производные некоторых аминокислот, образующиеся уже после включения обычных аминокислот в молекулу белка (табл. 3.4).

За исключением глицина, у которого R—это атом водорода, у всех аминокислот четыре группы, связанные с α-углеродным атомом, различны. Благодаря тетраэдрическому расположению четырех

[1] Гидролиз—это разрыв ковалентной связи с присоединением атомов молекулы воды.

Рис. 3.1. Два способа изображения α-аминокислоты.

разных групп относительно α-углеродного атома аминокислота обладает оптической активностью (способностью поворачивать плоскость поляризации плоскополяризованного света). Одни аминокислоты, входящие в состав белков, являются (при pH 7,0) правовращающими, а другие — левовращающими, однако все они имеют **абсолютную конфигурацию** L-глицеральдегида и поэтому являются L-α-аминокислотами.

ИОННЫЕ ФОРМЫ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты несут по крайней мере две слабоионизируемые кислые группы, —COOH и —NH_3^+. В растворе эти группы находятся в двух формах, заряженной и незаряженной, между которыми поддерживается протонное равновесие:

$$R—COOH \rightleftarrows R—COO^- + H^+,$$
$$R—NH_3^+ \rightleftarrows R—NH_2 + H^+.$$

R—COOH и R—NH_3^+ здесь являются **протонированными** партнерами, т. е. **кислотами**, а R—COO^- и R—NH_2 — **сопряженными основаниями** (т.е. акцепторами протонов) соответствующих кислот. И R—COOH, и R—NH_3^+ — это слабые кислоты, и все же R—COOH является в несколько тысяч раз более сильной кислотой, чем R—NH_3^+. При значениях pH, характерных для плазмы крови и межклеточной жидкости (7,4 и 7,1 соответственно), карбоксильные группы находятся исключительно в форме **карбоксилатных ионов**, R—COO^-. При этих значениях pH бóльшая часть аминогрупп находится преимущественно в ассоциированной (протонированной) форме, R—NH_3^+. Преобладающая ионная форма аминокислот, присутствующих в крови и в большинстве тканей, представлена на рис. 3.2,*А*. Структура, изображенная на рис. 3.2.*Б*, не может существовать *ни при каких* pH. При значениях pH, достаточно низких для протонирования карбоксильной группы, аминогруппа, намного более слабая кислота, также будет протонирована. Примерные значения pK_a α-карбоксильной и α-аминогрупп α-аминокислоты равны 2 и 10 соответственно (табл. 3.1). Кислота при pH ниже своего pK_a будет преимущественно протонирована, причем если pH будет сдвинуто на 2 единицы ниже pK_a, она будет протонирована на 99%. По мере увеличения pH карбоксильная группа теряет свой протон намного раньше, чем R—NH_3^+. При высоких значениях pH, достаточных для перехода аминогруппы преимущественно в форму незаряженного сопряженного основания, карбоксильная группа будет находиться в виде карбоксилатного иона (R—COO^-). Однако для удобства во многих уравнениях, когда речь не идет о протонных равновесиях, часто используется структура, изображенная на рис. 3.2,*Б*.

Относительную кислотность слабых кислот можно охарактеризовать с помощью константы диссоциации кислоты K_a или соответствующего ей pK_a — отрицательного логарифма константы диссоциации:

$$pK_a = -\log K_a.$$

В табл. 3.1 представлены кислотные группы и значения p*K* для функциональных групп 20 аминокислот, входящих в состав белков.

Полный (суммарный) заряд (алгебраическая сумма всех положительных и отрицательных зарядов) аминокислоты **зависит от pH, т.е. от концентрации протонов в окружающем растворе.** Заряд аминокислоты или ее производного можно изменить, варьируя pH; это облегчает физическое разделение аминокислот, пептидов и белков.

Значение pH, при котором **суммарный заряд аминокислоты равен нулю** и поэтому она не перемещается в постоянном электрическом поле, называется ее **изоэлектрической точкой (pI)**. Для алифатических аминокислот, таких как аланин, изоэлектрическая форма имеет вид, представленный на рис. 3.3.

Изоэлектрическая точка находится посредине между ближайшими значениями p*K* диссоциирующих групп по разные стороны от pI. Для аминокислоты, имеющей только две диссоциирующие группы, никакой неоднозначности при подсчете pI не возникает. Найдем, например, pI для аланина. Поскольку pK_1 (R—COOH) = 2,35 и pK_2 (R—NH_3^+) = 9,69, изоэлектрическая точка (pI) аланина равна

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2,35 + 9,69}{2} = 6,02.$$

Рассчитать pI для соединения, содержащего более двух диссоциирующих групп, труднее, и в этом

Рис. 3.2. *А*. Правильная ионная структура аминокислоты при значениях pH, близких к физиологическим. *Б*. Незаряженная форма, которая не может существовать ни при каких значениях pH; впрочем, такого типа формулу удобно использовать при обсуждении химии аминокислот.

Таблица 3.1. Слабокислые группы аминокислот, входящих в состав белков

Группа	Сопряженная кислота	Сопряженное основание	Примерное значение pK_a
α-Карбоксильная	R–COOH	$R{-}COO^-$	2,1 ± 0,5
ω-Карбоксильная (аспартат, глутамат)	R–COOH	$R{-}COO^-$	4,0 ± 0,3
Имидазольная (гистидин)	имидазолий (HN, NH, +, R)	имидазол (HN, N, R)	6,0
α-Аминогруппа	$R{-}NH_3^+$	$R{-}NH_2$	9,8 ± 1,0
ε-Аминогруппа (лизин)	$R{-}NH_3^+$	$R{-}NH_2$	10,5
Фенольная OH-группа (тирозин)	R–C₆H₄–OH	$R{-}C_6H_4{-}O^-$	10,1
Гуанидиновая (аргинин)	$R{-}NH{-}C(NH_2){=}NH_2^+$	$R{-}NH{-}C({=}NH){-}NH_2$	12,5
Сульфгидрильная (цистеин)	R–SH	$R{-}S^-$	8,3

случае можно ошибиться. Чему, например, будет равна изоэлектрическая точка для аспарагиновой кислоты, если исходить из данных, приведенных на рис. 3.4? Чтобы однозначно ответить на этот вопрос, нужно выписать все ионные структуры, возможные для данного соединения, в том порядке, в котором они образуются при переходе от сильнокислого к щелочному раствору (как это было сделано для аспарагиновой кислоты на рис. 3.4). Затем следует найти область pH изоионной (цвиттерионной), т.е. нейтральной, формы (как на рис. 3.4,*Б*). pI — это значение pH посредине между ближайшими значениями p*K* по разные стороны от изоионной формы. Для данного примера

$$pI = \frac{2{,}09 + 3{,}86}{2} = 2{,}98.$$

Этот подход в равной мере применим для других аминокислот с диссоциирующими группами в боковой цепи, например для лизина или гистидина. Выписав формулы для всех возможных заряженных форм осно́вных аминокислот, лизина и аргинина, получаем

$$pI = \frac{pK_2 + pK_3}{2}.$$

Для лизина pI = 9,7, для аргинина pI = 10,8. Предлагаем вам найти pI гистидина.

Описанный выше подход — оценка заряда структур, p*K* которых находится по разные стороны от pI цвиттериона,— пригоден не только для аминокислот. Его можно применять для оценки заряда молекулы с любым числом диссоциирующих групп. Умение выполнять такие расчеты оказывается очень ценным для работы в клинической лаборатории, поскольку позволяет предсказать подвижность соединений в электрическом поле и подобрать соответ-

NH_3^+ … O^- … O

Рис. 3.3. Изоэлектрическая форма аланина («цвиттерион»). Хотя цвиттерион содержит заряженные группы, его заряд равен нулю, поэтому в постоянном электрическом поле он не перемещается.

pK₁ = 2,09 (α-COOH) — pK₂ = 3,86 (β-COOH) — pK₃ = 9,82 (−NH₃⁺)

А — В сильнокислой среде (pH < 1) полный заряд = +1

Б — При pH около 3 полный заряд = 0

В — При pH в интервале 6—8 полный заряд = −1

Г — В сильнощелочной среде (pH > 11) полный заряд = −2

Рис. 3.4. Протонное равновесие для аспарагиновой кислоты.

ствующий буфер для их разделения. Например, для разделения двух соединений со значениями pI 6 и 8 пригоден буфер с pH 7,0, поскольку при этом pH молекулы с pI = 6 будут нести суммарный отрицательный заряд, а молекулы с pI = 8 — положительный.

СТРУКТУРА АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты, входящие в состав белков, можно разбить на две большие группы на основе того, какими являются R-группы, связанные с атомом α-углерода,— полярными или неполярными (табл. 3.2).

В табл. 3.3 приведены трехбуквенные и однобуквенные обозначения аминокислот, которые широко используются в биохимии. Однобуквенные обозначения применяются для записи наиболее длинных аминокислотных последовательностей (например, полных аминокислотных последовательностей белков).

Аминокислоты, находящиеся в свободном состоянии или входящие в состав других соединений (не белков), выполняют важную функцию во многих метаболических процессах (табл. 3.4 и 3.5). Например, аминокислоты орнитин, цитруллин и аргининосукцинат (табл. 3.4) участвуют в метаболизме мочевины. В природных объектах обнаружено свыше 20 D-аминокислот. К их числу относятся D-аланин и D-глутамат, входящие в состав клеточных стенок некоторых бактерий; ряд D-аминокислот входят в состав антибиотиков.

Таблица 3.2. Классификация L-α-аминокислот, входящих в состав белков, основанная на относительной полярности их R-групп

Неполярные	Полярные
Аланин	Аргинин
Валин	Аспарагин
Изолейцин	Аспарагиновая кислота
Лейцин	Гистидин
Метионин	Глицин
Пролин	Глутамин
Триптофан	Глутаминовая кислота
Фенилаланин	Лизин
	Серин
	Тирозин
	Треонин
	Цистеин

РАСТВОРИМОСТЬ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты содержат по нескольку заряженных групп, поэтому они легко сольватируются и хорошо растворяются в полярных растворителях (вода, этанол) и не растворяются в растворителях неполярных (бензол, гексан, эфир). Температура плавления аминокислот весьма высока (> 200° С). Это тоже обусловлено присутствием в них заряженных групп. Для разрыва ионных связей, стабилизирующих структуру кристалла, нужно сравнительно большое количество энергии.

ОБЩИЕ ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Карбоксильные и аминогруппы аминокислот вступают во все реакции, характерные для этих групп, т.е. в реакции образования солей, этерификации и ацилирования.

Цветные реакции

Нингидрин (рис. 3.5) осуществляет окислительное декарбоксилирование α-аминокислот с образованием CO_2, NH_3 и альдегида, содержащего на один атом углерода меньше, чем исходная аминокислота. Восстановленный нингидрин далее реагирует с выс-

Рис. 3.5. Нингидрин.

Таблица 3.3. L-α-аминокислоты, входящие в состав белков[1]

Наименование	Сокращенное обозначение	Структурная формула
С алифатическими боковыми цепями		
Глицин	Gly(G)	$H-CH(^+NH_3)-COO^-$
Аланин	Ala(A)	$CH_3-CH(^+NH_3)-COO^-$
Валин	Val(V)	$(H_3C)_2CH-CH(^+NH_3)-COO^-$
Лейцин	Leu(L)	$(H_3C)_2CH-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$
Изолейцин	Ile(I)	$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(^+NH_3)-COO^-$
С боковыми цепями, содержащими гидроксильные (OH) группы		
Серин	Ser(S)	$CH_2(OH)-CH(^+NH_3)-COO^-$
Треонин	Thr(T)	$CH_3-CH(OH)-CH(^+NH_3)-COO^-$
Тирозин	Tyr(Y)	См. ниже
С боковыми цепями, содержащими атом серы		
Цистеин[2]	Cys(C)	$CH_2(SH)-CH(^+NH_3)-COO^-$
Метионин	Met(M)	$CH_2(S-CH_3)-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$
С боковыми цепями, содержащими кислые группы или их амиды		
Аспарагиновая кислота	Asp(D)	$^-OOC-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$
Аспарагин	Asn(N)	$H_2N-C(=O)-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$

[1] За исключением гидроксилизина (Hyl) и гидроксипролина (Hyp), которые включаются в полипептидную цепь в виде лизина и пролина, а затем гидроксилируются (см. гл. 29 и 54). Для всех перечисленных в таблице аминокислот имеются специфические тРНК, поэтому их включение в белок осуществляется под прямым генетическим контролем.

[2] Цистин состоит из двух остатков цистеина, связанных дисульфидной связью:

$$^-OOC-CH(NH_3^+)-CH_2-S-S-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$$

Наименование	Сокращенное обозначение	Структурная формула
Глутаминовая кислота	Glu(E)	$^{-}OOC-CH_2-CH_2-$ [redacted]
Глутамин	Gln(Q)	$H_2N-\underset{\underset{O}{\Vert}}{C}-CH_2-CH_2-$ [redacted]
С боковыми цепями, содержащими основные группы		
Аргинин	Arg(R)	$H-\underset{\underset{\underset{NH_2}{\vert}}{\overset{\vert}{C}=\overset{+}{N}H_2}}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH}-COO^{-}$
Лизин	Lys(K)	$\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH_2}-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH}-COO^{-}$
Гистидин	His(H)	(имидазольное кольцо: HN, $^{+}$NH)$-CH_2-\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH}-COO^{-}$
Содержащие ароматические кольца		
Гистидин	His(H)	См. выше
Фенилаланин	Phe(F)	$C_6H_5-CH_2-\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH}-COO^{-}$
Тирозин	Tyr(Y)	$HO-C_6H_4-CH_2-\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH}-COO^{-}$
Триптофан	Trp(W)	(индольное кольцо, N–H)$-CH_2-\underset{\underset{^{+}NH_3}{\vert}}{CH}-COO^{-}$
Иминокислоты		
Пролин	Pro(P)	[redacted]

Таблица 3.4. Некоторые α-аминокислоты, не входящие в состав белков, но играющие важную роль в метаболизме

Название	Формула при нейтральном pH	Роль
Гомоцистеин (2-Амино-4-меркаптомасляная кислота)	$CH_2(SH)-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Промежуточное соединение в биосинтезе цистеина (гл. 29)
Цистеинсульфиновая кислота (2-Амино-3-сульфинопропионовая кислота)	$CH_2(SO_2)-CH(^+NH_3)-COO^-$	Промежуточное соединение в катаболизме цистеина (гл. 31)
Гомосерин (2-Амино-4-гидроксимасляная кислота)	$CH_2(OH)-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Промежуточное соединение в метаболизме треонина, аспарагиновой кислоты и метионина (гл. 31)
Орнитин (2,5-Бисаминопентановая кислота)	$CH_2(^+NH_3)-CH_2-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Промежуточное соединение в метаболизме треонина, аспарагиновой кислоты и метионина (гл. 31)
Цитруллин (2-Амино-5-уреидопентановая кислота)	$CH_2(NH-C(=O)-NH_2)-CH_2-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Промежуточное соединение в биосинтезе мочевины (гл. 31)
Аргининоянтарная кислота	$^-OOC-CH_2-C(COO^-)-HN-C(=\overset{+}{N}H)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Промежуточное соединение в биосинтезе мочевины (гл. 31)
ДОФА (3,4-Дигидроксифенилаланин)	$HO-C_6H_3(OH)-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Предшественник меланина (гл. 32)
3-Монойодтирозин	$HO-C_6H_3(I)-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	Предшественник тиреоидных гормонов
3,5-Дийодтирозин	$HO-C_6H_2(I)_2-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	То же
3,5,3′-Трийодтиронин (T_3)	$HO-C_6H_3(I)-O-C_6H_2(I)_2-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	„
Тироксин (3,5,3′,5′-Тетрайодтиронин; T_4)	$HO-C_6H_2(I)_2-O-C_6H_2(I)_2-CH_2-CH(^+NH_3)-COO^-$	„

Таблица 3.5. Некоторые аминокислоты, не содержащие α-аминогрупп и играющие важную роль в метаболизме млекопитающих

Обычное и систематическое название	Формула при нейтральном pH	Роль
β-Аланин (3-Аминопропионат)	$CH_2—CH_2—COO^-$; $|$; $^+NH_3$ (на первом CH_2)	Составная часть кофермента А и витамина пантетеина (гл. 17)
Таурин (2-Аминоэтилсульфонат)	$CH_2—CH_2—SO_3^-$; $|$; $^+NH_3$ (на первом CH_2)	Находится в желчи в составе конъюгатов желчных кислот (гл. 27)
γ-Аминомасляная кислота (ГАМК)	$CH_2—CH_2—CH_2—COO^-$; $|$; $^+NH_3$ (на первом CH_2)	Нейромедиатор, образующийся из глутамата в ткани мозга (гл. 32)
β-Аминоизомасляная кислота (2-Метил-3-аминопропионат)	$H_3N^+—CH_2—CH—COO^-$; $|$; CH_3 (на CH)	Конечный продукт катаболизма пиримидинов, иногда обнаруживаемый в моче некоторых больных (гл. 35)

вободившимся аммиаком, образуя голубой комплекс с максимумом поглощения при λ_{max} = 570 нм. Образование этого окрашенного соединения используется в количественном тесте на α-аминокислоты, с помощью которого можно обнаружить аминокислоты, даже если их количество не превышает 1 мкг. Нингидрин реагирует не только с α-аминокислотами, но и с другими аминами; при этом тоже появляется голубая окраска, но без выделения CO_2. Таким образом, выделение CO_2 является индикатором участия в реакции α-аминокислоты. NH_3 и пептиды тоже вступают в реакцию, но менее активно, чем α-аминокислоты. Продукт реакции между пролином (или 4-гидроксипролином) и нингидрином имеет желтую окраску.

Флуорескамин (рис. 3.6) является еще более чувствительным реагентом, позволяющим обнаруживать аминокислоты в количестве порядка нанограмм. Как и нингидрин, он образует комплекс не только с аминокислотами, но и с другими аминами.

Образование пептидных связей

Наиболее важной реакцией, в которой участвуют аминокислоты, является образование **пептидных связей.** При этом высвобождается одна молекула воды (рис. 3.7). Однако реакция осуществляется не так, как она представлена на рисунке, поскольку равновесие сильно сдвинуто в сторону гидролиза пептидной связи. Для образования пептидной связи между двумя аминокислотами карбоксильная группа должна быть предварительно активирована. Химический синтез осуществляется путем предварительного образования хлорангидрида. Биологическая активация включает взаимодействие с АТР.

Рис. 3.6. Флуорескамин.

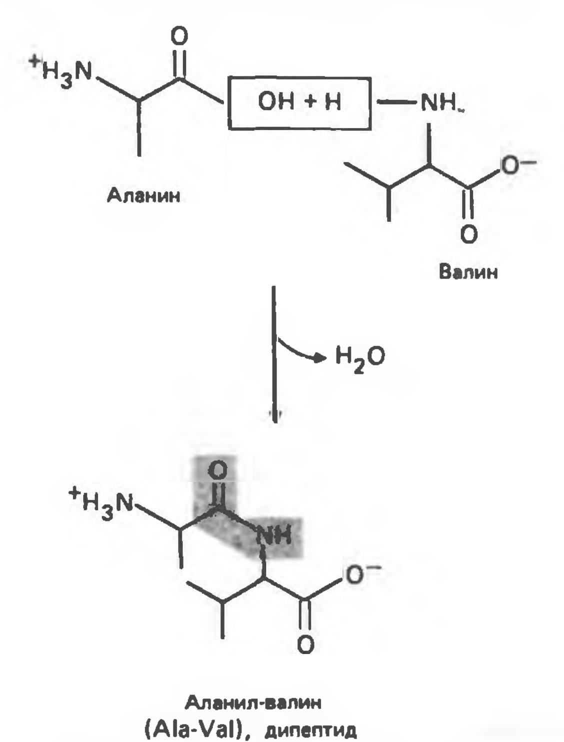


Рис. 3.7. Соединение аминокислот пептидной связью (затененная область).

СВОЙСТВА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Глицин, наименьшая из аминокислот, может локализоваться в таких областях трехмерной структуры белковой молекулы, которые недоступны другим аминокислотам.

Алифатические R-группы аланина, валина, лейцина и изолейцина и ароматические R-группы фенилаланина, тирозина и триптофана гидрофобны; это свойство приводит к одному очень важному последствию — образованию упорядоченного поверхностного слоя молекул воды в области поверхности молекулы белка, где экспонированы неполярные R-группы. Заряженные R-группы оснóвных и кислых аминокислот играют важную роль в стабилизации специфической конформации белка путем образования солевых связей. Кроме того, аминокислоты с положительно и отрицательно заряженными R-группами, а также гистидин могут участвовать в формировании систем «переноса заряда», которые в ходе ферментативного катализа обеспечивают перемещение заряда на значительные расстояния. Наконец, уникальная и очень важная роль в ферментативном катализе принадлежит гистидину — pK имидазольной группы таково, что эта аминокислота при pH = 7 может попеременно выступать в роли оснóвного или кислотного катализатора.

Первичная спиртовая группа серина и первичная тиоспиртовая (—SH) группа цистеина являются в определенных условиях хорошими нуклеофилами и участвуют в ферментативном катализе. Хотя вторичная спиртовая группа треонина тоже является нуклеофилом, данные о ее возможной каталитической роли отсутствуют. Помимо каталитической функции —OH-группа серина участвует в регуляции активности некоторых ключевых ферментов метаболизма, активность которых зависит от фосфорилирования определенных остатков серина.

Аминокислоты не поглощают свет в видимой области (иными словами, они не окрашены). За исключением ароматических аминокислот триптофана, тирозина, фенилаланина и гистидина, они не поглощают и в ультрафиолетовой области при длинах волн выше 240 нм. Как видно из рис. 3.8, поглощение белков в этой области обусловлено в основном триптофаном.

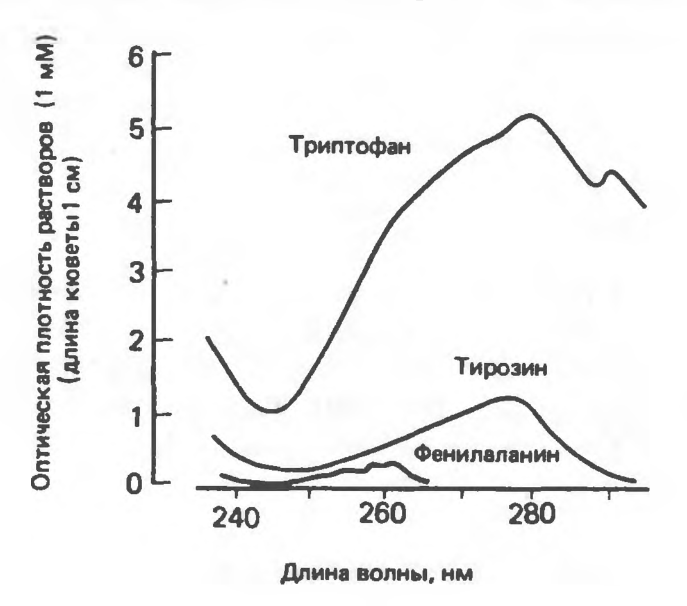


Рис. 3.8. Спектры поглощения триптофана, тирозина и фенилаланина в УФ-области.

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Хроматография

При всех хроматографических методах разделения молекулы **распределяются между стационарной и подвижной фазами** (табл. 3.6). **Разделение зависит от относительной способности содержащихся в смеси молекул к более прочной ассоциации с одной или другой фазой.**

Здесь мы рассмотрим в основном методы разделения аминокислот, однако применение этих методов ни в коей мере не ограничивается данными молекулами.

Хроматография на бумаге

Сейчас этот метод в значительной мере вытеснен более совершенными методами, однако он все же применяется для разделения аминокислот. Образцы наносят на бумагу в заранее отмеченную точку, отступив примерно 5 см от верхнего края полоски фильтровальной бумаги. Затем полоску подвешивают в закрытом сосуде, на дно которого налита смесь растворителей (рис. 3.9).

Для разделения аминокислот используют полярные растворители в виде бинарных, тройных и более сложных смесей воды, спиртов, кислот и оснований. Более полярные компоненты растворителя ассоциируются с целлюлозой и образуют стационарную фа-

Таблица 3.6. Физическое состояние фаз в хроматографических системах, используемых в биохимии

Хроматографическая система	Стационарная фаза	Подвижная фаза
Распределительная хроматография на бумаге, в тонком слое порошка целлюлозы, на колонке с инертным носителем, покрытым тонким слоем жидкости; гель-фильтрация	Жидкая	Жидкая
Ионообменная хроматография: адсорбция на тонких слоях или частицах, заполняющих колонку	Твердая	”
Распределительная хроматография (между тонким слоем жидкости на носителе и подвижным газом)	Жидкая	Газообразная

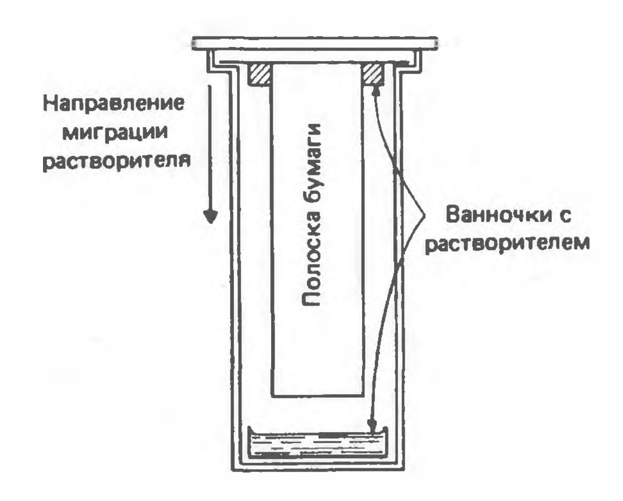


Рис. 3.9. Устройство для хроматографии на бумаге (в нисходящем варианте).

зу, а менее полярные составляют подвижную фазу. Это — **нормальная распределительная хроматография**. В **распределительной хроматографии с обращенной фазой** полярная и неполярная фазы меняются местами (для этого, например, бумагу предварительно погружают в раствор силикона). Распределительная хроматография с обращенной фазой используется для разделения неполярных пептидов или липидов; для таких полярных соединений, как аминокислоты, она непригодна. Растворитель перемещается по бумаге вверх или вниз (восходящая или нисходящая хроматография). Когда он доходит почти до конца, полоску вынимают из сосуда, высушивают и обрабатывают определенным образом, чтобы на ней проявились интересующие исследователя соединения (при разделении аминокислот используют обработку 0,5%-ным нингидрином в ацетоне с последующим прогреванием в течение нескольких минут при 90—110°). Аминокислоты с объемными неполярными боковыми цепями (Leu, Ile, Phe, Trp, Val, Met, Tyr) перемещаются быстрее, чем аминокислоты с более короткими неполярными боковыми цепями (Pro, Ala, Gly) или с полярными боковыми цепями (Thr, Glu, Ser, Arg, Asp, His, Lys, Cys) (рис. 3.10). Это обусловлено большей растворимостью полярных молекул в гидрофильной стационарной фазе и неполярных — в органических растворителях. Отметим, что в ряду неполярных аминокислот (Gly, Ala, Val, Leu) при увеличении длины неполярной боковой цепи, сопровождающемся усилением ее неполярного характера, увеличивается и подвижность аминокислоты.

Отношение расстояния, на которое перемещается данная аминокислота, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (оба они отсчитываются от точки нанесения смеси аминокислот), обозначают через R_f (подвижность по отношению к фронту растворителя). Значение R_f для данной аминокислоты зависит от условий эксперимента, например от типа растворителя. Хотя предварительную идентификацию аминокислоты можно провести исходя лишь из ее значения R_f, рекомендуется одновременно с не-

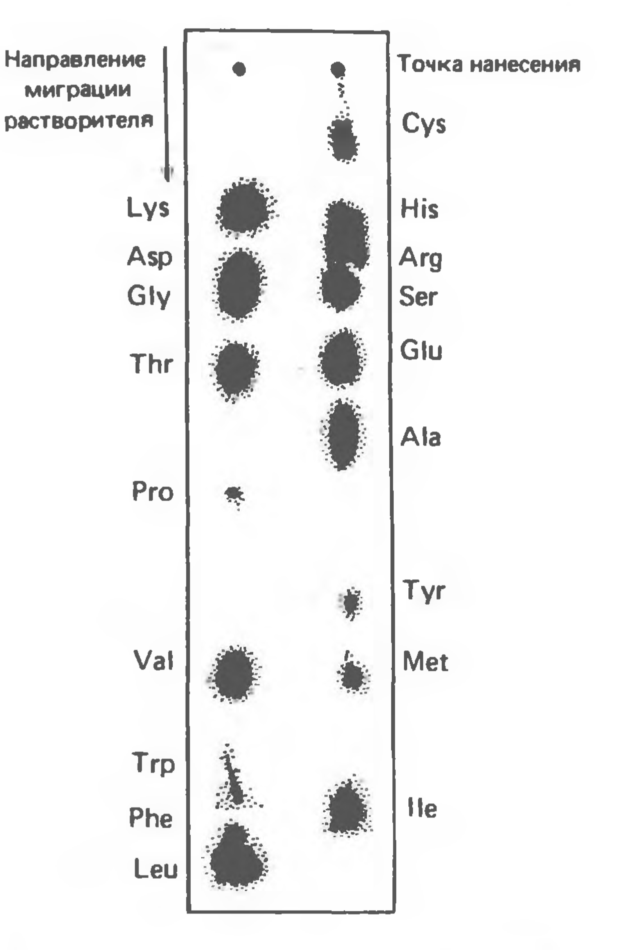


Рис. 3.10. Идентификация аминокислот, входящих в состав белков. После хроматографического разделения на бумаге с использованием в качестве растворителя системы бутанол/уксусная кислота (нисходящий вариант) аминокислоты окрашивают нингидрином.

известной смесью проводить хроматографирование известной стандартной смеси аминокислот. В этом случае подвижность исследуемой аминокислоты можно отнести к подвижности стандарта (например, не R_f, а R_{Ala}). Подвижности, выраженные относительно стандарта, меняются от эксперимента к эксперименту в меньшей степени, чем R_f.

Для количественного анализа аминокислот каждое пятно вырезают и элюируют (вымывают) вещество подходящим растворителем; затем проводят количественный колориметрический (нингидриновый) анализ. В другом варианте бумагу опрыскивают нингидрином и измеряют с помощью фотометра интенсивность окрашивания пятна в проходящем или отраженном свете.

При **двумерной хроматографии на бумаге** образец наносят на один из углов квадратного листа бумаги и проводят разделение в одной системе растворителей. Затем лист вынимают, высушивают, поворачивают его на 90° и хроматографируют в другом растворителе (рис. 3.11).

Тонкослойная хроматография

Имеются два четко различающихся варианта тонкослойной хроматографии. Распределительная тонкослойная хроматография (РТСХ) сходна с рас-

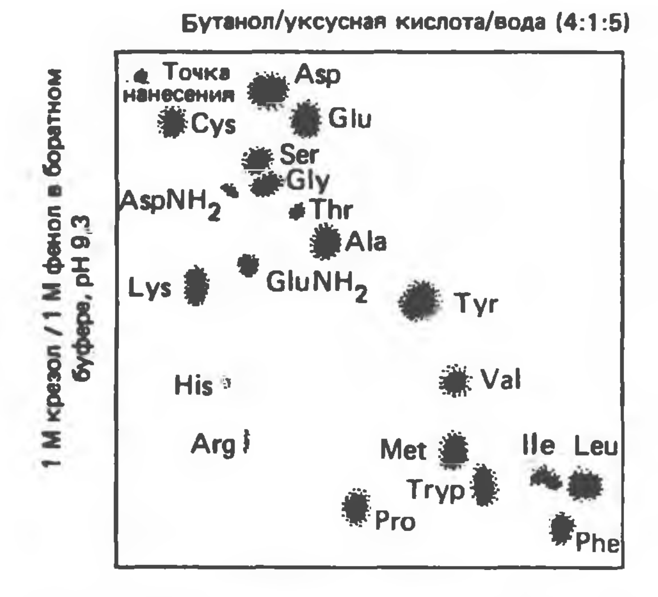


Рис. 3.11. Двумерная хроматограмма аминокислот, входящих в состав белка (воспроизведена с некоторыми модификациями из работы Anal. Chem. 1953:**25**:396).

пределительной хроматографией на бумаге, а адсорбционная тонкослойная хроматография (АТСХ) основана на совершенно иных принципах.

При проведении РТСХ на порошке целлюлозы или на других сравнительно инертных носителях можно использовать такие же системы растворителей и такие же проявляющие реагенты, как и при хроматографии на бумаге. Возможна и РТСХ с обращенной фазой.

Разделение с помощью АТСХ определяется способностью растворителя (этот растворитель не обязательно является бинарной или более сложной смесью) элюировать компоненты образца с места его адсорбции на активированном сорбенте, например на нагретом силикагеле. АТСХ применима для разделения таких неполярных соединений, как липиды, но не для разделения аминокислот и большинства пептидов.

Автоматическая ионообменная хроматография

Разделение аминокислот можно проводить разными методами, но для анализа аминокислотного состава полипептида после его гидролиза обычно используют **автоматическую ионообменную хроматографию.** Полное разделение аминокислот, их идентификация и количественная оценка занимают менее трех часов. В методе Мура и Штейна используют короткую и длинную колонки, заполненные смолой из сульфонированного полистирола в Na^+-форме. Когда кислотный гидролизат при pH 2 наносят на колонку, аминокислоты связываются в результате катионного обмена с Na^+. Далее колонку элюируют раствором цитрата натрия при заранее запрограммированных значениях pH и температуры. Короткую колонку элюируют одним буфером, длинную — двумя. Элюат обрабатывают нингидрином, измеряя интенсивность окраски с помощью проточного колориметра. Данные автоматически регистрируются на ленте самописца и могут передаваться в компьютер для вычисления площади под пиком (рис. 3.12).

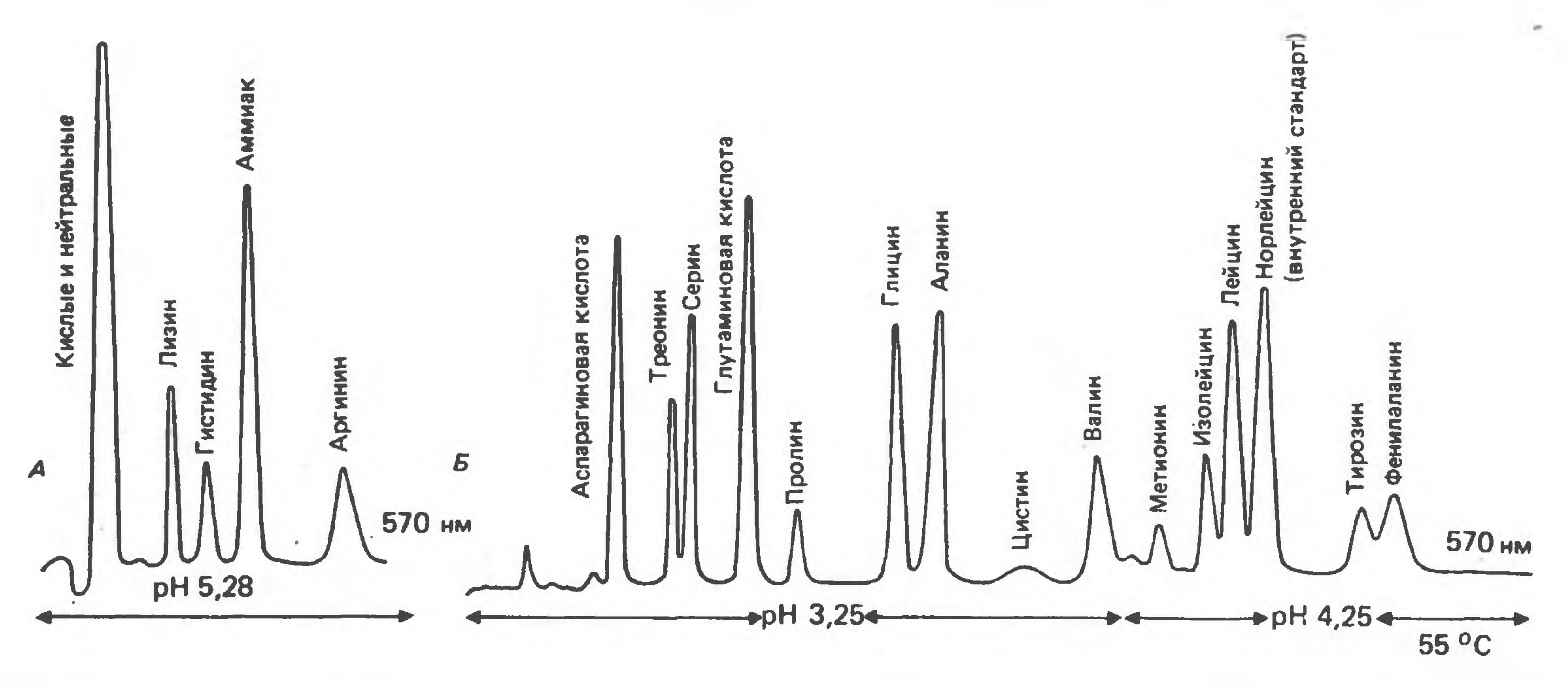


Рис. 3.12. Автоматический анализ кислотного гидролизата эндосперма пшеницы по Муру и Штейну на колонках дауэкс-50 (при 55°С). *А.* Для идентификации осно́вных аминокислот используется короткая колонка (5 × 0,9 см); элюирование проводят при pH 5,28, продолжительность опыта 60 мин. *Б.* Для разделения нейтральных и кислых аминокислот используется более длинная колонка (55 × 0,9 см); элюирование проводят сначала буфером с pH 3,25, а затем буфером с pH 4,25. В качестве внутреннего стандарта добавлен норлейцин. Осно́вные аминокислоты остаются на колонке. Продолжительность опыта 180 мин. Элюируемые фракции автоматически обрабатывают нингидрином, после чего измеряют их оптическую плотность при 570 и 440 нм. Регистрация при длине волны 440 нм используется исключительно для идентификации пролина и гидроксипролина (в эндосперме пшеницы они отсутствуют). (С любезного разрешения E. T. Mertz, Purdue University.)

Высоковольтный электрофорез на инертных носителях

В биохимии широкое применение нашло разделение аминокислот, полипептидов и других амфолитов (молекул, суммарный заряд которых зависит от pH среды) под действием наложенного постоянного электрического поля. При разделении аминокислот в качестве инертных носителей чаще всего используют полоски бумаги или тонкие слои целлюлозного порошка. Разделение проводят в течение 0,5—2 ч при напряжении 2000—5000 В в зависимости от суммарных зарядов амфолитов и их молекулярных масс. Среди молекул, несущих одинаковый заряд, более легкие мигрируют быстрее. Но более важным параметром при разделении является суммарный заряд. Метод применяется для разделения аминокислот, низкомолекулярных пептидов, некоторых белков, нуклеотидов и сахарофосфатов. Образец помещают на носитель, смачивают буфером при соответствующем pH и соединяют с буферным резервуаром полоской фильтровальной бумаги. Бумагу прикрывают стеклянной пластинкой или погружают в углеводородный растворитель для охлаждения. В электрическом поле молекулы, несущие при данном pH отрицательный заряд, мигрируют к аноду, а те, которые несут положительный заряд,— к катоду. Далее высушенную электрофореграмму «проявляют» нингидрином (при работе с аминокислотами, пептидами) или измеряют поглощение в Уф-свете (при работе с нуклеотидами).

Выбор pH определяется значениями p*K* диссоциирующих групп, входящих в состав молекул смеси. При pH 6,4 глутамат и аспартат несут заряд — 1 и движутся к аноду; разделение их осуществляется благодаря различию в молекулярной массе. Лизин, аргинин и гистидин движутся в противоположном направлении, а все другие аминокислоты, входящие в состав белка, остаются вблизи места нанесения. При разделении пептидов, образовавшихся в результате ферментативного расщепления, уменьшение pH до 3,5 приводит к увеличению заряда катионных групп и обеспечивает лучшее разделение.

ЛИТЕРАТУРА

Barrett G. C. Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Chapman and Hall, 1985.

Cooper T. G. The Tools of Biochemistry, Wiley, 1977.

Friedman M. The Chemistry and Biochemisrty of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides, and Proteins, Pergamon Press, 1973.

Greenstein J. P., Winitz M. Chemictry of the Amino Acids, 3 vols, Wiley, 1961.

Heftman E. Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods, 3rd ed., Van Nostrand, 1975.

Touchstone J. C. Practice of Thin Layer Chromatography, Wiley-Interscience, 1978.

Zweig G., Sherma J. Handbook of Chromatography, 2 vols, CRC Press, 1972.

Глава 4

Пептиды

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Когда карбоксильная и аминогруппа аминокислот соединяются, образуя пептидную связь, соответствующие аминокислоты превращаются в аминокислотные остатки. **Пептид состоит из двух или более аминокислотных остатков, связанных пептидными связями.** Пептиды из более чем 10 аминокислотных остатков называются **полипептидами.**

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Пептиды имеют очень большое биомедицинское значение; особенно велика их роль в эндокринологии. Пептидами являются многие важнейшие гормоны человека. Их часто назначают больным для коррекции соответствующей недостаточности. Самый известный пример — введение инсулина больным сахарным диабетом. Пептидами являются также различные антибиотики (валиномицин, грамицидин А) и некоторые противоопухолевые препараты (например, блеомицин). Разработанные в последние годы методы быстрого химического синтеза пептидов позволили наладить производство пептидных гормонов в значительных количествах; это разрешило многие проблемы, поскольку обычно гормоны присутствуют в организме животных в очень малых концентрациях и их трудно выделить в количествах, достаточных для терапевтических целей. По той же технологии осуществляется синтез и других пептидов, которые ввиду их малого содержания тоже трудно выделять из природных источников; в частности, это относится к вирусным пептидам, используемым в качестве вакцин.

СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ

Общие сведения о структуре пептида

На рис. 4.1 изображен трипептид, состоящий из аминокислотных остатков аланина, цистеина и валина. Отметим, что **трипептид содержит три остатка, но не три пептидные связи.** Структуру пептида принято изображать так, чтобы **N-концевой остаток** (содержащий свободную α-аминогруппу) **располагался слева,** а **С-концевой остаток** (со свободной α-карбоксильной группой) — справа. Такой пептид имеет **только одну** свободную α-аминогруппу и **только одну** α-карбоксильную группу. Это справедливо для всех полипептидов, которые образованы только аминокислотными остатками, соединенными друг с другом пептидными связями, образовавшимися между α-аминогруппой и α-карбоксильной группой. В некоторых пептидах концевая аминогруппа или концевая карбоксильная группа модифицирована (примером могут служить ацильное производное аминогруппы или амид карбоксильной группы) и,таким образом, не является свободной.

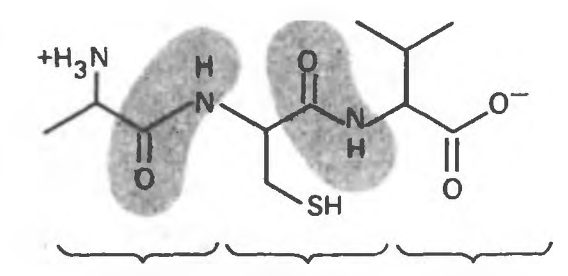


Рис. 4.1. Структурная формула трипептида. Пептидные связи для наглядности затенены.

Запись структурной формулы пептидов

Укажем самый простой способ записи. Во-первых, нарисуем «остов» из связанных друг с другом α-NH_2- и α-СООН-групп и из атомов α-углерода. Эти группы чередуются вдоль остова цепи. Затем подсоединим к α-углеродным атомам соответствующие боковые группы. Опишем эту процедуру подробнее.

1. Вычертим зигзагообразную линию произвольной длины и добавим слева N-концевую аминогруппу:

$^{+}H_3N$ (зигзагообразная линия)

2. Встроим в цепочку α-углеродные атомы, α-карбоксильную и α-аминную группы:

3. Присоединим соответствующие R-группы (они затенены) и атомы α-водорода к α-углеродным атомам:

Glu-Ala-Lys-Gly-Tyr-Ala
E A K G Y A

Рис. 4.2. Представление первичной структуры гексапептида с помощью трехбуквенных и однобуквенных обозначений аминокислотных остатков. Данный гексапептид содержит на N-конце глутамат (Glu, E), а на C-конце аланин (Ala, A).

Первичная структура пептида

Линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется **первичной структурой пептида**. Чтобы определить первичную структуру полипептида, нужно установить **число, химическую структуру** и **порядок расположения** всех аминокислотных остатков, входящих в его состав.

Полипептиды (белки) могут содержать 100 и более остатков, поэтому традиционные структурные формулы оказываются неудобными для представления первичной структуры. «Химическая скоропись» использует либо трехбуквенные, либо однобуквенные обозначения аминокислот, выписанные во втором столбце табл. 3.3 (рис. 4.2). **При наименовании пептида его рассматривают как производное C-концевого аминокислотного остатка.**

Если первичная структура однозначно установлена, то трехбуквенные обозначения аминокислотных остатков соединяют черточками. Однобуквенные обозначения черточками не соединяют. Если на каком-то участке полипептидной цепи точный **порядок** следования аминокислотных остатков неизвестен, эти остатки заключают в скобки и разделяют запятыми (рис. 4.3).

Glu-Lys-(Ala, Gly, Tyr)-His-Ala

Рис. 4.3. Гептапептид, содержащий участок, точная первичная структура которого не установлена.

Физиологические последствия изменений в первичной структуре

Замена всего одной аминокислоты на другую в линейной последовательности из 100 и более аминокислот может привести к снижению или полной потере биологической активности пептида, а это повлечет за собой весьма серьезные последствия (в качестве примера можно привести серповидноклеточную анемию; см. гл. 6). Многие наследуемые нарушения метаболизма обусловлены именно одиночными заменами такого типа. С развитием новых мощных методов определения структуры белков и ДНК удалось выяснить биохимическую основу многих наследуемых болезней, связанных с нарушениями метаболизма.

ИОННЫЕ ФОРМЫ ПЕПТИДОВ

Пептидная (амидная) группа остается незаряженной при всех физиологических значениях pH. Образование пептида из аминокислот при pH 7,4 сопровождается потерей одного отрицательного и одного положительного заряда на каждую образовавшуюся пептидную связь. Однако пептиды при физиологических pH несут суммарный заряд, поскольку заряженными являются C- и N-концевые группы и связанные с α-углеродными атомами заряженные боковые цепи (табл. 3.1).

Полипептиды, так же как аминокислоты и другие заряженные молекулы, можно выделить с помощью методов, основанных на разделении по заряду (электрофорез, ионообменная хроматография). Значение p*K* C-концевой карбоксильной группы полипептида выше, чем у α-карбоксильной группы соответствующей аминокислоты (т.е. пептидная COOH-группа — более слабая кислота). Протонированная N-концевая аминогруппа, напротив, является более сильной кислотой (с более низким значением p*K*), чем аминогруппа соответствующей свободной аминокислоты, от которой она произошла (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Значения p*K* для глицина и глициновых пептидов

	p*K*(COOH)	p*K*(NH_3^+)
Gly	2,34	9,60
Gly-Gly	3,12	8,17
Gly-Gly-Gly	3,26	7,91

КОНФОРМАЦИЯ ПЕПТИДОВ В РАСТВОРЕ

Теоретически пептид может находиться в самых разнообразных конформационных состояниях (т. е. иметь множество вариантов пространственного расположения атомов). Однако, судя по имеющимся данным, в растворе диапазон возможных конформаций невелик. Наличие преимущественных конформаций обусловлено такими факторами, как стерические ограничения, кулоновские взаимодействия, водородные связи и гидрофобные взаимодействия (гл. 5). Как и в случае белков, физиологическая активность полипептидов (например, ангиотензина и вазопрессина) тоже зависит от их конформации (гл. 45, 48).

Физиологически активные пептиды

Животные, растительные и бактериальные клетки содержат множество разных полипептидов (от 3 до 100 аминокислотных остатков), обладающих высокой физиологической активностью. Некоторые из них, в частности большинство полипептидных гормонов млекопитающих, содержат только пептидные связи, образованные между α-амино- и α-карбоксильной группами двадцати L-α-аминокислот, входящих в состав белков. Однако в полипептидах (но не в белках) могут содержаться и другие аминокислоты или производные обычных, встречающихся в белках, аминокислот. Приведем несколько примеров такого рода.

Короткие полипептиды брадикинин и каллидин вызывают расслабление гладких мышц и являются продуктами ограниченного протеолиза специфических белков плазмы. Поскольку эти пептиды происходят из белков, они содержат только аминокислоты, встречающиеся в белках:

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Брадикинин
Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Каллидин

Глутатион (рис. 4.4) встречается во всех видах организмов; это атипичный трипептид, в котором N-концевой глутамат и цистеин связаны не α-пептидной связью. В организме человека и других животных глутатион необходим для работы ряда ферментов. По имеющимся представлениям, глутатион вместе с ферментом глутатионредуктазой участвует в образовании «правильных» дисульфидных связей во многих белках и полипептидных гормонах (гл. 5).

Рис. 4.4. Глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин).

Полипептидные антибиотики, синтезируемые грибами, часто содержат как D-, так и L-аминокислоты, а также некоторые аминокислоты, не встречающиеся в белках. Примерами могут служить тироцидин и грамицидин S — циклические полипептиды, содержание D-фенилаланин и «небелковую» аминокислоту орнитин. Синтез этих полипептидов осуществляется не в рибосомах.

Еще одним примером служит тиреолиберин (рис. 4.5). Его N-концевой глутамат циклизован с образованием остатка пироглутаминовой кислоты, а C-концевая карбоксильная группа пролина амидирована.

Рис. 4.5. Тиреолиберин (пироглутамилгистидилпролинамид).

В организме млекопитающих синтезируется полипептид, включающий несколько полипептидов, потенциально обладающих физиологической активностью. β-Липотропин — гипофизарный гормон, стимулирующий освобождение жирных кислот из жировой ткани,— содержит аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям некоторых других полипептидных гормонов с иной физиологической активностью (рис. 4.6). Этот высокомолекулярный полипептид служит предшественником полипептидов меньшего размера.

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ

Хроматография и высоковольтный электрофорез

Эти методы (гл. 3) применимы для разделения не только аминокислот, но и низкомолекулярных полипептидов.

Гель-фильтрация

При автоматическом секвенировании (определении аминокислотной последовательности) используют крупные (30—100 остатков) пептиды. Однако многие денатурированные высокомолекулярные полипептиды оказыватся нерастворимыми. Это связано с тем, что гидрофобные остатки, ранее укрытые

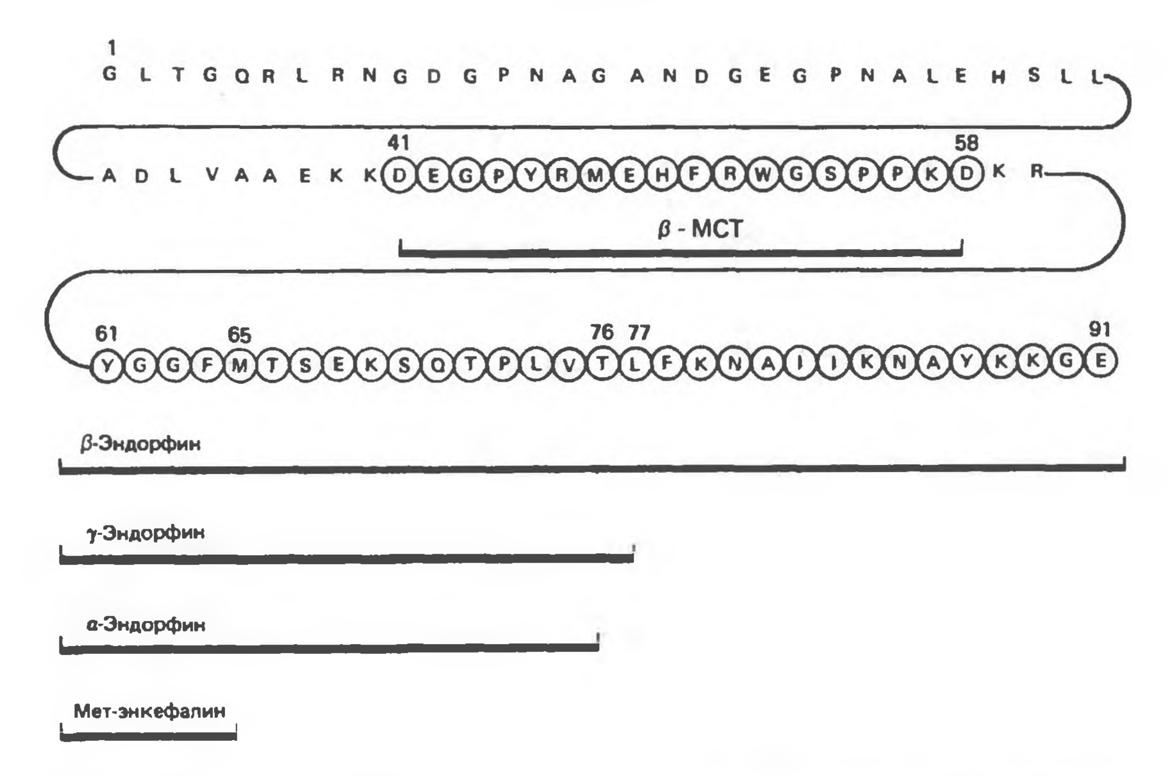


Рис. 4.6. Первичная структура β-липотропина. Фрагмент, включающий остатки 41—58, соответствует меланоцитстимулирующему гормону (β-МСТ), а фрагмент, состоящий из остатков 61—91, включает последовательности указанных эндорфинов.

внутри молекулы, при денатурации могут экспонироваться. Такие полипептиды можно в принципе растворить в мочевине, спиртах, органических кислотах и основаниях, но это ограничивает возможности последующего разделения пептидов с помощью ионообменной хроматографии. Впрочем, гель-фильтрацию крупных гидрофобных пептидов можно проводить в 1—4 М муравьиной или уксусной кислоте (рис. 4.7).

Жидкостная хроматография на колонках с обращенной фазой при высоком давлении

Мощным методом очистки высокомолекулярных неполярных пептидов является жидкостная хроматография при высоком давлении на неполярных материалах с использованием для элюирования полярных растворителей. Рис. 4.8 иллюстрирует разделение с помощью этого метода тех же бромциановых фрагментов фетального глобина человека, которые фигурировали на рис. 4.7. Совместно используя гель-фильтрацию и указанный метод, можно разделить сложные смеси пептидов, полученные путем частичного протеолиза. Для разделения крупных пептидов созданы новые стационарные фазы.

Высоковольтный электрофорез на молекулярных ситах

В этом методе используются одновременно и разделение по заряду, и эффект молекулярного сита. В качестве сита применяют крахмал и агарозу, а также полимер акриламида ($CH_2 = CH{\cdot}CONH_2$) с поперечными сшивками. Если **электрофорез проводится в полиакриламидном геле (ПАГ)**, то раствор белка наносят на насыщенные буфером блоки полиакриламида, «прошитого» метиленбисакриламидом («бис») (степень сшивания 2—10%) или другим аналогичным сшивающим реагентом. Для проявления используют кумасси синий или Ag^+ (полипептиды), бромистый этидий (полинуклеотиды) и т. д. Весьма распространено использование электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Белок прогревают и затем проводят электрофорез в присутствии денатурирующих агентов — мочевины или додецилсульфата натрия (ДСН), чтобы создать условия, благоприятные для разделения молекул по размеру. Электрофорез в ПАГ-ДСН широко используется для определения молекулярной массы белковых субъединиц; метод основан на сравнении их подвижности с подвижностью стандартных препаратов известной молекулярной массы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПЕПТИДОВ

Прежде всего путем гидролиза разрушают пептидные связи. Поскольку при нейтральных рН пептидные связи стабильны, применяют кислотный или щелочной катализ. Ферментативный катализ для полного гидролиза менее пригоден. Полный гидролиз белка на составляющие аминокислоты неизбежно сопровождается частичной потерей некоторых аминокислотных остатков. Лучше всего проводить

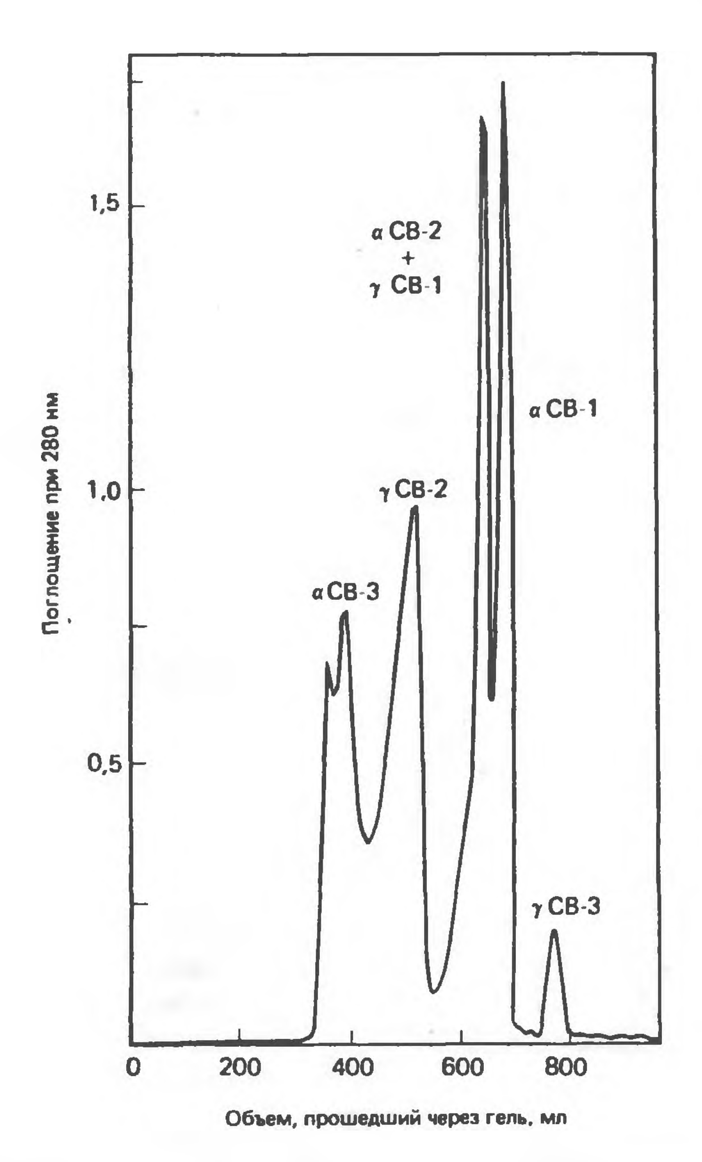


Рис. 4.7. Гель-фильтрация бромциановых (CB) фрагментов фетального глобина человека. Хроматография проведена на колонке сефадекс G-50, уравновешенной 1%-ным HCOOH, с последующей элюцией тем же раствором. Нумерация фрагментов α- и γ-цепей произвольна. (С любезного разрешения J. D. Pearson et al., Department of Biochemistry, Purdue University.)

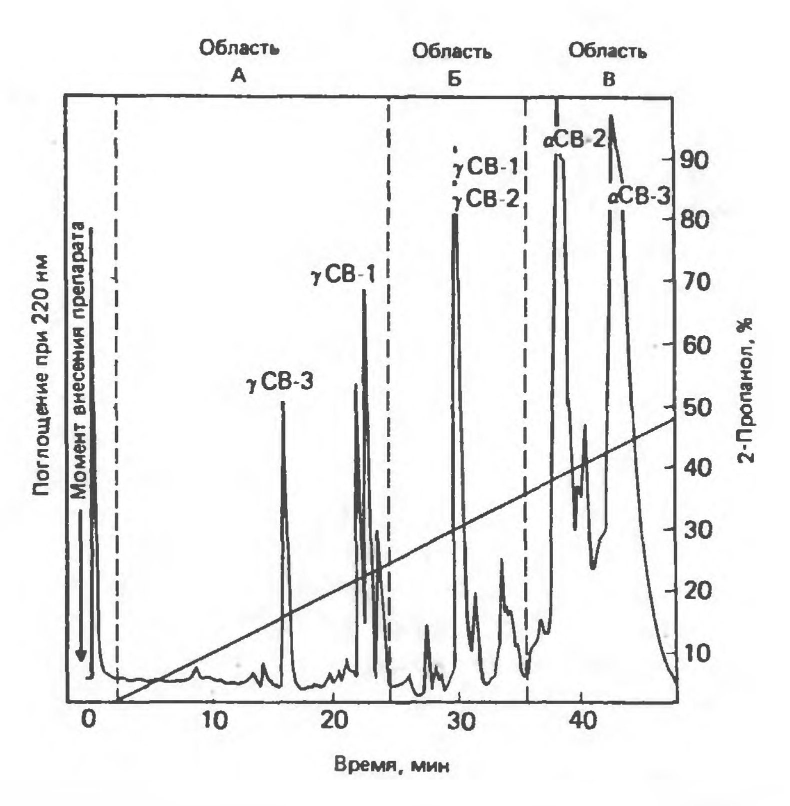


Рис. 4.8. Жидкостная хроматография с обращенной фазой при высоком давлении: профиль элюирования бромциановых (CB) фрагментов фетального глобина человека. Нумерация фрагментов α- и γ-цепей произвольна. (С любезного разрешения J. D. Pearson et al., Department of Biochemistry, Purdue University.)

гидролиз в 6 н. HCl при 110 °C в вакуумированной ампуле. В этих условиях полностью разрушаются триптофан и цистеин и частично цистин. В присутствии металлов наблюдается частичная потеря метионина и тирозина. Глутамин и аспарагин количественно дезамидируются в глутамат и аспартат. Содержание серина и треонина тоже оказывается заниженным, причем в тем большей степени, чем дольше проводится гидролиз. Наконец, некоторые связи между нейтральными остатками (Val-Val, Ile-Ile, Val-Ile, Ile-Val) даже через 20 ч гидролизуются лишь на 50%. Обычно параллельные пробы гидролизуют в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Затем данные по серину и треонину наносят на график в полулогарифмическом масштабе и проводят экстраполяцию к нулевому моменту времени. По валину и изолейцину используют результаты, полученные при 96-часовом гидролизе. Дикарбоновые кислоты и их амиды определяются суммарно и регистрируются как "Glx" или "Asx". Цистеин и цистин до гидролиза превращают в кислотостабильные производные (например, в цистеиновую кислоту). Для анализа триптофана проводят щелочной гидролиз; при этом происходят разрушение серина, треонина, аргинина и цистеина и рацемизация всех аминокислот. По окончании гидролиза аминокислотный состав можно определить с помощью **автоматической ионообменной хроматографии** (см. рис. 3.12) или жидкостной хроматографии под давлением.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДОВ

Уже более трех десятилетий минуло с тех пор, как Сенгер поразил биохимический мир, установив с помощью химических и ферментативных методов полную первичную структуру гормона инсулина. Подход Сенгера состоял в следующем. Сначала он разделил две полипептидные цепи инсулина, A и B, и далее провел их специфическое ферментативное расще-

пление на небольшие пептиды, содержащие перекрывающиеся участки последовательности. Он разделил эти пептиды и, используя реагент 1-фтор-2,4-динитробензол (рис. 4.9), идентифицировал их N-концевые остатки. Кроме того, он определил аминокислотный состав пептидов и в итоге смог установить их структуру. Сравнивая последовательности перекрывающихся пептидов, он однозначно установил первичную структуру обеих цепей, A и B.

В общих чертах стратегия Сенгера сохранила свое значение и до наших дней, однако за истекшие десятилетия были разработаны два новых подхода, которые произвели революцию в определении первичной структуры полипептидов (белков). Первый подход основан на разработанной Эдманом в 1967 г. автоматической процедуре последовательного отщепления и идентификации N-концевых аминокислотных остатков в виде их фенилтиогидантоиновых производных. Второй подход связан с методом, разработанным Сенгером и, независимо, Максамом и Гилбертом, позволяющим проводить быстрое и однозначное секвенирование гена, кодирующего рассматриваемый белок. Оптимальная стратегия состоит в одновременном использовании обоих подходов. Автоматическая деградация по Эдману, намного более быстрая по сравнению с первоначальным ручным методом Сенгера, тем не менее сильно уступает по скорости методам секвенирования ДНК и сопряжена с рядом трудностей. С другой стороны, секвенирование ДНК не всегда дает однозначную первичную структуру исследуемого белка. Главным

Рис. 4.9. Реакция аминокислоты с 1-фтор-2,4-динитробензолом (реагентом Сенгера). Реагент назван в честь нобелевского лауреата (1958 г.) биохимика Фредерика Сенгера, который использовал его для определения первичной структуры инсулина. Вначале арилируют (с количественным выходом) всех свободные аминогруппы, после гидролиза пептида образуются 2,4-динитрофенил-производные аминокислот, обладающие яркой желтой окраской. Количественный анализ этих производных осуществляют спектрофотометрическими методами. С динитрофторбензолом реагируют также ε-аминогруппа лизина, имидазольная группа гистидина, OH-группа тирозина и SH-группа цистеина. Динитрофенильные группы не отщепляются при кислотном гидролизе и используются для идентификации N-концевых аминокислот в полипептидах.

осложнением при секвенировании эукариотических генов является присутствие внутри гена **интронов** (гл. 38), которые не считываются в ходе экспрессии и не представлены в зрелом белке. В то же время большим преимуществом метода секвенирования ДНК является относительная легкость обнаружения и секвенирования участков, присутствующих только в предшественнике белка и отщепляемых при его созревании. Таким образом, секвенирование ДНК и автоматическая процедура Эдмана дополняют друг друга; их совместное использование коренным образом изменило и расширило наши знания о первичной структуре белков. Секвенирование ДНК мы рассмотрим в гл. 38, а процедуру Эдмана — в следующем разделе.

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ЭДМАНА

Разделение на линейные полипептиды

Молекулы многих белков содержат более одной полипептидной цепи; эти цепи связаны либо нековалентными связями, либо дисульфидными мостиками. Поэтому первым шагом должно быть выделение индивидуальных полипептидных цепей. Диссоциацию нековалентно связанных полипептидов проводят с помощью денатурирующих агентов (мочевины, гуанидингидрохлорида), которые разрывают водородные связи. Дисульфидные мостики разрушают с помощью окисляющих и восстанавливающих агентов (рис. 4.10). Затем проводят хроматографическое разделение полипептидов.

Расщепление полипептида на фрагменты, пригодные для автоматического секвенирования

Приборы для автоматического секвенирования (секвенаторы) работают наиболее эффективно, когда длина полипептидов составляет 20—60 остатков. Эти требования в значительной мере способствовали разработке методов расщепления полипептидов на фрагменты нужного размера и их очистки. Основной задачей стало не получение большого числа малых фрагментов, пригодных для ручного секвенирования, а расщепление на малое число крупных фрагментов (от 30 до 100 остатков). При этом желательно было осуществить полное высокоспецифичное расщепление по ограниченному числу связей. Этим требованиям отвечает расщепление цианогенбромидом (CNBr), трипсином и *о*-иодозобензолом.

А. CNBr. Предварительно проводят модификацию остатков цистеина иодоуксусной кислотой. Далее с помощью CNBr специфически расщепляют связи на COOH-стороне от остатков метионина,

Рис. 4.10. Две соседние полипептидные цепи соединены дисульфидной связью (затенена). Расщепление этой связи путем окисления надмуравьиной кислотой (*слева*) или путем восстановления β-меркаптоэтанолом (*справа*) приводит к образованию двух пептидов, содержащих остатки цистеиновой кислоты или цистеина соответственно.

в большинстве случаев с количественным выходом. Остатки метионина в полипептидах встречаются достаточно редко, поэтому в результате такого расщепления образуются пептидные фрагменты желаемого размера.

Б. Трипсин. Трипсин расщепляет связи на COOH-стороне от остатков лизина и аргинина. Чтобы ограничить число мест разрыва, остатки лизина предварительно модифицируют цитраконовым ангидридом (реакция носит обратимый характер); в результате положительный заряд остатков лизина заменяется на отрицательный. Модификация остатков аргинина менее целесообразна, поскольку остатки лизина встречаются относительно чаще. Однако она бывает полезна для дальнейшего расщепления CNBr-фрагментов.

В. *о*-Иодозобензол. Этот реагент специфически и с количественным выходом расщепляет сравнительно редкие связи типа Trp-X. Предварительной защиты других остатков при этом не требуется.

Г. Гидроксиламин. Гидроксиламин расщепляет сравнительно редко встречающиеся связи Asn-Gly, но выход не является количественным.

Д. Протеаза из *Staphylococcus aureus* V8 расщепляет связи типа Glu-X, преимущественно в тех случаях, когда X — гидрофобный остаток. Связь Glu-Lys не расщепляется. Эта реакция полезна также для последующего расщепления CNBr-фрагментов.

Е. Мягкий кислотный гидролиз. Расщеплению подвергаются редко встречающиеся связи Asp-Pro.

Двух-трех наборов фрагментов, обычно получаемых при расщеплении исходного полипептида по остаткам Met, Trp, Arg и по связям Asn-Gly, вместе с субфрагментами, полученными при дополнительном расщеплении, обычно оказывается достаточно для определения полной первичной структуры полипептида. Если не возникает каких-либо непредвиденных трудностей в очистке фрагментов, то при должной тщательности для всей процедуры необходимо всего несколько микромолей полипептида.

Фрагменты очищают с помощью гель-фильтрации в уксусной или муравьиной кислоте (рис. 4.7), с помощью жидкостной хроматографии с обращенной фазой при высоком давлении (рис. 4.8) или ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе или на сульфофенил-сефадексе.

Реагент Эдмана и реакция Эдмана

При автоматическом секвенировании вместо реагента Сенгера применяют фенилизотиоцианат (реагент Эдмана); в результате реакции происходит отщепление N-концевого остатка в виде его фенилтиогидантоинового производного (реакция Эдмана; рис. 4.11).

Все реакции протекают в пленке раствора, которая покрывает стенки вращающейся цилиндрической камеры. Это облегчает экстракцию и последующее удаление растворителей. Несколько фирм выпускают приборы, позволяющие проводить полностью автоматизированное определение последовательности полипептидов, содержащих до 30—40 остатков (в некоторых случаях до 60 или даже до 80 остатков) за один прогон. В прибор заложена программа последовательного отщепления по Эдману N-концевых остатков полипептида. После отщепления, выделения и идентификации исходной N-концевой аминокислоты (рис. 4.11) образуется эдмановское производное следующей аминокислоты и т. д. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных производят с помощью жидкостной хроматографии под давлением. На таком приборе можно определить последовательность значительно более длинных участков, чем при секвенировании вручную, причем гораздо быстрее.

Взаимодействие пептида с фенилизотиоцианатом (реагентом Эдмана)

Фенилтиогидантоиновая кислота

H^+, нитрометан

H_2O

Фенилтиогидантоин и пептид, укороченный на один остаток

Рис. 4.11. Образование фенилтиогидантоина из аминокислоты (или N-концевого остатка полипептида). Фенилизотиоцианат реагирует с аминогруппами аминокислот или пептидов с образованием фенилтиогидантоиновых производных. Последующая их обработка кислотой в растворителях, не содержащих гидроксильных групп, приводит к циклизации производных с образованием фенилтиогидантоинов. Эта реакция, позволяющая идентифицировать N-концевой остаток пептида, используется при автоматическом секвенировании полипептидов.

Установление полной первичной структуры путем сравнения последовательностей перекрывающихся пептидов

Последний шаг состоит в воссоздании последовательности, в которой просеквенированные пептиды располагались в исходном белке. Для этого необходимо иметь пептиды, полученные разными методами в результате разрыва белковой цепи в различных местах (например, с использованием трипсина и химотрипсина). Сопоставив последовательности полученных пептидов, однозначно устанавливают первичную структуру (рис. 4.12).

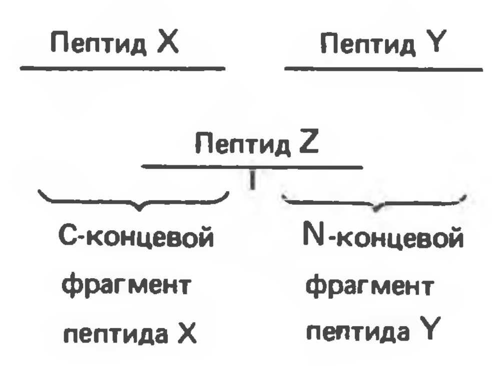


Рис. 4.12. Используя пептид Z, последовательность которого перекрывается с последовательностями пептидов X и Y, можно установить, что в исходном белке пептиды X и Y располагаются в порядке X→Y, но не Y→X.

АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

С помощью классических химических методов удалось синтезировать октапептиды вазопрессин и окситоцин, а позднее — брадикинин, однако выходы конечного продукта были столь низкими, что нельзя было надеяться на возможность синтеза более длинных полипептидов или белков. Эту задачу удалось решить методом автоматического твердофазного синтеза, разработанным Меррифилдом. Весь процесс проводится в одном сосуде, в который автоматически по заданной программе, через определенные промежутки времени, добавляются реагенты, удаляются продукты и т. д. Процесс состоит из следующих этапов.

1. Аминокислота, которая будет находиться на С-конце полипептида, присоединяется к нерастворимой частичке смолы.

2. Вводится вторая аминокислота с предварительно блокированной соответствующим реагентом аминогруппой, и в присутствии дегидратирующего агента дициклогексилкарбодиимида образуется пептидная связь.

3. Блокирующая группа отщепляется кислотой; при этом образуются газообразные продукты, которые удаляются.

4. Стадии 2 и 3 повторяются со следующей присоединяемой (второй) аминокислотой, далее с третьей, и так до тех пор, пока к частичке смолы не окажется присоединенным полностью синтезированный полипептид.

5. Полипептид отщепляется от частички смолы.

Процесс протекает быстро и с прекрасным выходом. На образование каждой пептидной связи затрачивается около 3 ч. Этим методом за 8 сут была синтезирована А-цепь инсулина (21 остаток) и за 11 сут — В-цепь (30 остатков). Наиболее выдающийся результат состоял в полном синтезе панкреатической рибонуклеазы (124 остатка; рис. 5.10) с общим выходом 18%; это был первый синтезированный фермент. Это достижение ознаменовало собой нача-

ло новой эры не только в области изучения структуры белка, но и в смежных областях, например в иммунологии, в производстве вакцин, а также, возможно, в медицине при лечении болезней, связанных с врожденными нарушениями метаболизма. Ряд физиологически важных пептидов был синтезирован из L-аминокислот с помощью методов, исключающих их рацемизацию; полученные продукты в полной мере обладали физиологической активностью. Примерами служат октапептиды окситоцин и вазопрессин, адренокортикотропный гормон (АКТГ) и меланоцитстимулирующий гормон (гл. 45).

ЛИТЕРАТУРА

Cantor C. R., Schimmel P. R. Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Macromolecules, Freeman, 1980. [Имеется перевод: Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия.— М: Мир, 1984.]

Chin C. C. O., Wold F. Separation of peptides on phosphocellulose and other cellulose ion exchangers, Methods Enzymol, 1977, **47**, 204.

Cooper T. G. The Tools of Biochemistry, Wiley, 1977.

Craig L. C., Cowburn D., Bleich H. Methods of the study of small polypeptide hormones and antibiotics in solution, Annu. Rev. Biochem., 1975, **44**, 509.

Dayhoff M. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, 1972, Suppl. 1, 1973; Suppl. 2, 1976; Suppl. 3, 1979.

Hash J. H. (ed.) Antibiotics. In: Methods in Enzymology, Vol. 43, Academic Press, 1975.

Heftman E. Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods, 3rd ed., Van Nostrand, 1975.

Jauregui-Adell J., Marti J. Acidic cleavage of the aspartyl-proline bond and the limitations of the reaction, Anal. Biochem., 1975, **69**, 468.

Mahoney W. C., Hermodson M. A. High-yield cleavage of tryptophanyl peptide bonds by *o*-iodosobenzoic acid, Biochemistry, 1979, **18**, 3810.

Mahoney W. C., Smith P. K., Hermodson M. A. Fragmentation of proteins with *o*-iodosobenzoic acid: Chemical mechanism and identification of *o*-iodosobenzoic acid as a reactive contaminant that modifies tyrosyl residues, Biochemistry, 1981, **20**, 443.

Marglin A., Merrifield R. B. Chemical synthesis of peptides and proteins, Annu. Rev. Biochem., 1970, **39**, 841.

Needelman S. B. (ed.) Protein Sequence Determination, Springer-Verlag, 1970.

Patthy L., Smith E. L. Reversible modification of arginine residues: Application to sequence studies by restriction of tryptic hydrolysis to lysine residues, J. Biol. Chem., 1975, **250**, 557.

Pearson J. D. et al. Reversed-phase supports for the resolution of large denatured protein fragments, J. Chromatogr., 1981, **207**, 325.

Regnier E. F., Gooding K. M. High performance liquid chromatography of proteins, Anal. Biochem., 1980, **103**, 1.

Snyder S. H., Innes R. B. Peptide neurotransmitters, Annu. Rev. Biochem., 1979, **48**, 755.

Stewart J. M., Young J. D. Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman, 1969.

Storm D. R., Rosenthal K. S., Swanson P. E. Polymyxin antibiotics, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 723.

Zweig G., Sherma J. Handbook of Chromatography, 2 vols, CRC Press, 1972.

Глава 5

Белки: структура и свойства

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Все белки являются **высокомолекулярными полипептидами**. Условную границу между крупными полипептидами и белками обычно проводят в области мол. масс 8000—10 000. **Простые белки** содержат только аминокислоты, а **сложные** — еще и неаминокислотные компоненты: гем, производные витаминов, липидные или углеводные компоненты. В этой главе мы рассмотрим свойства простых белков. Уникальные свойства специфических сложных белков, в том числе гемопротеинов (гл. 6), гликопротеинов (гл. 54) и липопротеинов (гл. 26), будут рассмотрены позднее, как и свойства простых белков с уникальной структурой, таких, как коллаген и сократительные белки (гл. 56),

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Белки играют центральную роль в процессах жизнедеятельности клеток (примером служат ферменты) и в формировании клеточных структур. Анализ содержания в крови определенных белков и ферментов широко используется в диагностических целях. В частности, при заболеваниях печени диагностическое обследование непременно включает электрофоретическое определение относительного содержания альбуминов и глобулинов в плазме крови. Анализ содержания в плазме липопротеинов и иммуноглобулинов с помощью электрофореза и других методов обычно используется при диагностике специфических типов гиперлипопротеинемии и иммунных нарушений. Моча человека в норме не содержит белков; поэтому обнаружение в моче даже небольших количеств белка (протеинурия) с помощью соответствующих лабораторных анализов служит важным показателем заболевания почек, в частности различных форм нефритов.

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

Удовлетворительной универсальной системы классификации белков не существует. Имеется лишь несколько общеупотребительных систем классификации, частично противоречащих одна другой. С точки зрения ключевых свойств белков все они имеют ограниченную ценность. Однако эти системы и соответствующая терминология используются в клинических лабораториях, поэтому имеет смысл вкратце рассмотреть их. Мы обсудим главные особенности систем классификации белков, основанных на растворимости, форме молекул, функциях, физических свойствах и трехмерной структуре.

Растворимость

Классификация белков, основанная на их растворимости, была введена в 1907—1908 гг. и используется до сих пор, особенно в клинической биохимии (табл. 5.1). Строго установленных границ между

Таблица 5.1. Классификация белков, основанная на их растворимости

Альбумины	Растворимы в воде и солевых растворах. Не имеют особенностей в смысле содержания отдельных аминокислот
Глобулины	Слаборастворимы в воде, но хорошо растворимы в солевых растворах. Не имеют особенностей в смысле содержания отдельных аминокислот
Проламины	Растворимы в 70—80%-ном этаноле, но нерастворимы в воде и в абсолютном этаноле. Богаты аргинином
Гистоны	Растворимы в солевых растворах
Склеропротеины	Нерастворимы в воде и солевых растворах. Повышено содержание Gly, Ala, Pro

классами не существует. Например, четкое разграничение между альбуминами и глобулинами невозможно, если исходить только из их растворимости в воде и солевых растворах. Поэтому глобулины подразделяют на псевдоглобулины, легко растворимые в воде, и эуглобулины, нерастворимые в воде, свободной от солей.

Форма молекул

Если исходить из **отношения осей** (продольной и поперечной), можно выделить два больших класса белков. У **глобулярных белков** отношение составляет менее 10 и в большинстве случаев не превышает 3—4. Они характеризуются компактной укладкой полипептидных цепей. Примерами служат инсулин, альбумины и глобулины плазмы, многие ферменты. **Фибриллярные белки**, у которых отношение осей превышает 10, состоят из пучков полипептидных цепей, спирально навитых друг на друга и связанных между собой поперечными ковалентными или водородными связями. Примерами служат кератин, миозин, коллаген и фибрин.

Функции

Белки можно классифицировать в соответствии с их биологическими функциями; например, можно подразделить белки на структурные, каталитические и транспортные (табл. 5.2). В свою очередь каталитические белки (ферменты), которые включают большинство различных типов белков, можно подразделить в соответствии с типом катализируемой ими реакции (гл. 7).

Физические свойства

Для ряда белков, представляющих медицинский интерес, существуют специализированные системы классификации, позволяющие устанавливать различия в пределах семейств сходных белков. Например, широко используются две и обсуждается третья система номенклатуры липопротеинов плазмы. В первой системе липопротеины классифицируют в соответствии с их поведением в электрическом или гравитационном поле; так, на основе электрофоретической подвижности при pH 8,6 различают «стартовые» α_1-, α_2-, β- и γ-липопротеины. Вторая система классификации липопротеинов основана на их плотности в гидратированном состоянии; в этом случае различают хиломикроны, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП и ЛПОВП (гл. 26). Возможен и третий тип классификации, основанный на первичной структуре апобелков. В этой системе различают шесть классов липопротеинов плазмы, характеризующихся присутствием апобелков A, B, C, D, E и F соответственно. Апобелки можно различать, используя иммунологические критерии.

Таблица 5.2. Основные функции белков

Функция	Белки
Каталитическая	Ферменты
Сократительная	Актин, миозин
Регуляция работы генов	Гистоны, негистоновые ядерные белки
Гормональная	Инсулин
Защитная	Фибрин, иммуноглобулины, интерферон
Регуляторная	Кальмодулин
Структурная	Коллаген, эластин, кератины
Транспортная	Альбумины (переносят билирубин, жирные кислоты и т. д.), гемоглобин (кислород), липопротеины (различные липиды), трансферрин (железо)

Трехмерная структура

Белки можно разграничивать и на основании того, имеют ли они четвертичную структуру (см. ниже). Кроме того, ценной основой для классификации белков служит структурное сходство ряда белков, выявляемое главным образом с помощью рентгеновской кристаллографии. Например, белки, связывающие нуклеотиды, обычно характеризуются присутствием в их третичной структуре «нуклеотидсвязывающего домена» и, возможно, являются эволюционно родственными белками.

СВЯЗИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

Первичная структура белков формируется в результате соединения L-α-аминокислот пептидными связями. Об этом свидетельствует множество различных данных, однако наиболее убедительным доказательством стал химический синтез инсулина и рибонуклеазы, осуществленный путем последовательного соединения аминокислот пептидными связями.

Структура большинства белков стабилизируется двумя классами прочных связей (пептидных и дисульфидных) и тремя классами слабых связей (водородных, гидрофобных и электростатических, т. е. солевых).

Жесткость пептидной связи

В структурных формулах пептидов связь между карбонильной группой и атомом α-азота изображается как одинарная, однако на самом деле эта связь между атомами углерода и азота носит характер частично двойной связи (рис. 5.1). Свободное вращение вокруг нее невозможно, и все четыре атома на рис.

Рис. 5.1. Резонансная стабилизация пептидной связи придает ей характер частично двойной связи; этим объясняется жесткость связи C—N.

5.1 лежат в одной плоскости (компланарны). Вращение же вокруг остальных связей полипептидного остова, наоборот, достаточно свободно. Это положение иллюстрирует рис. 5.2, где связи, вокруг которых возможно свободное вращение, охвачены круглыми стрелками, а группы компланарных атомов затенены. Эта полужесткость ведет к важным последствиям, сказывающимся на более высоких уровнях структурной организации белка.

Межцепочечные и внутрицепочечные поперечные дисульфидные связи

Дисульфидная связь образуется между двумя остатками цистеина и «сшивает» два участка полипептидной цепи (или цепей), которым принадлежат эти остатки. Эта связь остается стабильной в тех условиях, при которых белок обычно денатурирует. Обработка белка надмуравьиной кислотой (окисляющей связи S—S) или β-меркаптоэтанолом (восстанавливающим связи S—S с регенерацией двух остатков цистеина) приводит к разделению полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями; их первичная структура при этом не затрагивается (см. рис. 4.10).

Стабилизация полипептидов межцепочечными и внутрицепочечными водородными связями

Водородные связи образуются 1) между группами, входящими в состав боковых цепей и способными к формированию водородных связей; 2) между атомами азота и кислорода, принадлежащими пептидным группам остова; 3) между полярными остатками, расположенными на поверхности молекулы белка, и молекулами воды. Все они играют важную роль в стабилизации вторичной, третичной и т. д. структур белка (см. разд. «α-Спираль» и «Складчатый β-слой»).

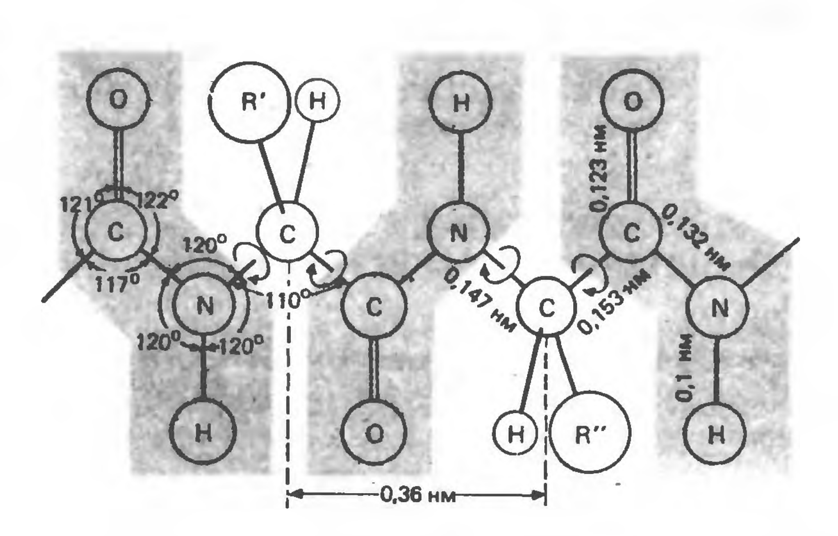


Рис. 5.2. Параметры полностью вытянутой полипептидной цепи. Четыре атома, расположенные в затененных областях, компланарны и образуют пептидную связь. В незатененных областях находятся атом α-углерода, атом α-водорода и α-R-группа соответствующей аминокислоты. Вокруг связей, соединяющих α-углерод с α-азотом и α-карбонилом, возможно свободное вращение (показано стрелками). Таким образом, вытянутая полипептидная цепь — это полужесткая структура, в которой две трети атомов остова (если рассматривать атомы по группам, образующим пептидную связь) занимают друг относительно друга фиксированное положение и находятся в одной плоскости. Расстояние между соседними атомами α-углерода 0,36 нм. Показаны также другие межатомные расстояния и валентные углы (они неэквивалентны). (С разрешения, из работы Pauling L., Corey R. B, Branson H. R.: The structure of proteins. Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1951:**37**:205.)

Гидрофобные взаимодействия

Неполярные боковые цепи нейтральных аминокислот в белках имеют тенденцию к ассоциации. Стехиометрические соотношения при этом не соблюдаются, так что никаких связей в обычном смысле не возникает. Тем не менее эти взаимодействия играют важную роль в поддержании структуры белка.

Электростатические связи

Эти солевые связи возникают между разноименно заряженными группами, входящими в состав боковых цепей аминокислот. Например, ε-аминогруппа лизина при физиологических pH несет заряд + 1, а карбоксильная группа аспартата или глутамата в составе боковой цепи несет заряд − 1. Следователльно, эти группы могут электростатически взаимодействовать, стабилизируя структуру белка.

Прочность связей

В ходе денатурации белков (например, при обработке мочевиной или додецилсульфатом натрия в присутствии избытка ионов H^+ и OH^-) водородные и гидрофобные связи, а также связи электростатической природы разрушаются, а пептидные и дисульфидные сохраняются.

УПОРЯДОЧЕННЫЕ КОНФОРМАЦИИ ПОЛИПЕПТИДОВ

α-Спираль

Основополагающим моментом в нашем понимании принципов организации белков послужило выявление того факта, что полипептидные цепи могут находиться в высокоупорядоченной конформации, стабилизируемой водородными связями между пептидными группами. Впоследствии существование подобных высокоупорядоченных структур было многократно подтверждено данными ретгеноструктурного анализа кристаллов белков при высоком разрешении, однако вначале концепция носила чисто теоретический характер.

Согласно рентгенографическим данным, полученным в начале 1930-х гг., α-кератины волос и шерсти обладают продольной периодичностью 0,5—0,55 нм. Однако в вытянутой полипептидной цепи расстояний, порождающих такую периодичность, найти не удавалось (рис. 5.2). Это кажущееся противоречие было устранено Полингом и Кори, предположившими, что полипептидные цепи α-кератина имеют форму α-спирали (рис. 5.3). В этой структуре R-группы при α-углеродных атомах направлены от оси спирали (рис. 5.4). На один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, а шаг спирали составляет 0,54 нм, что близко к периодичности 0,5—0,55 нм, наблюдаемой на дифракционных картинах. Смещение вдоль оси, приходящееся на один остаток, равно 0,15 нм, что тоже согласуется с рентгеновскими данными. Основные характеристики α-спирали сводятся к следующему (рис. 5.5).

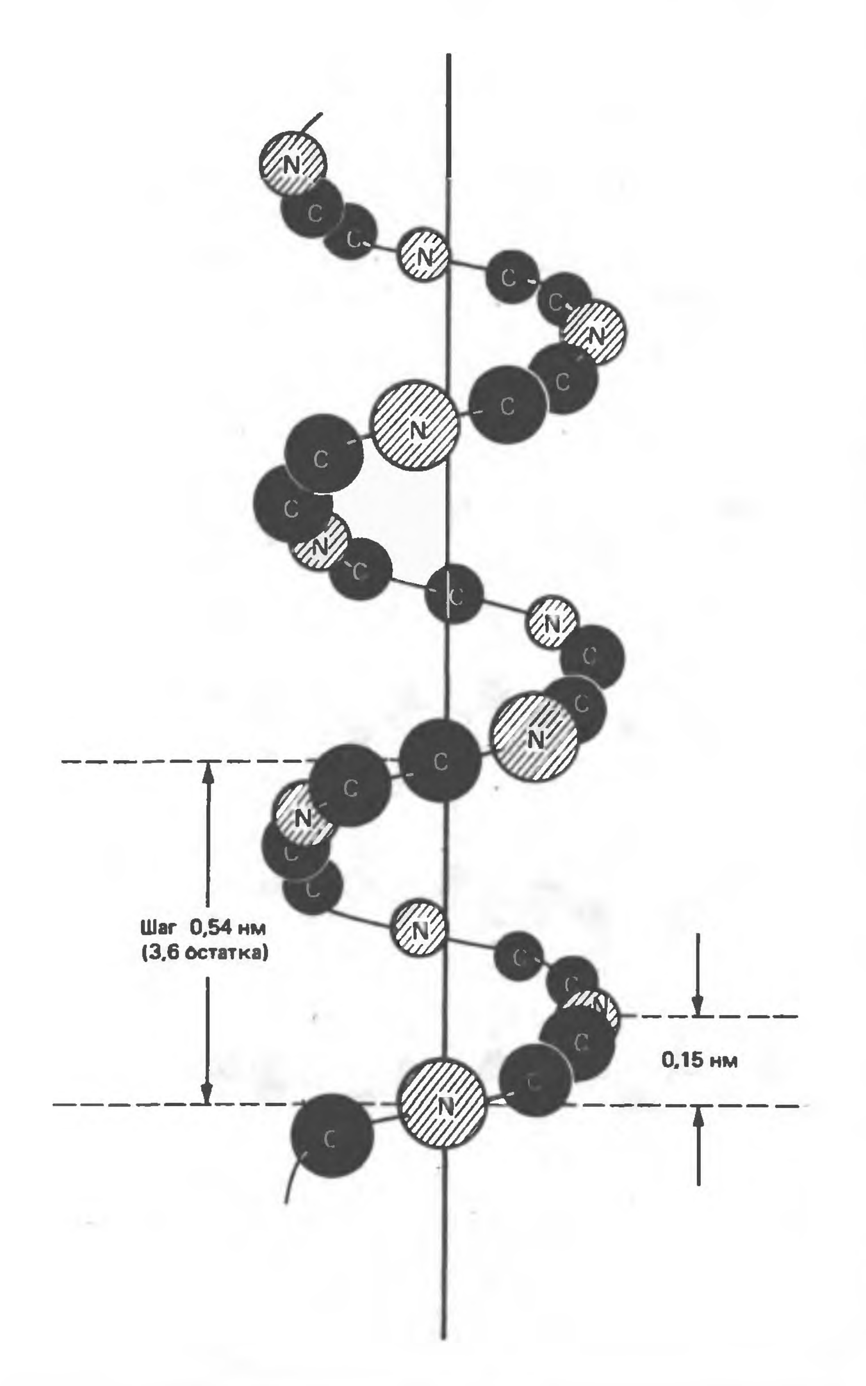


Рис. 5.3. Расположение атомов остова пептидной цепи относительно оси α-спирали.

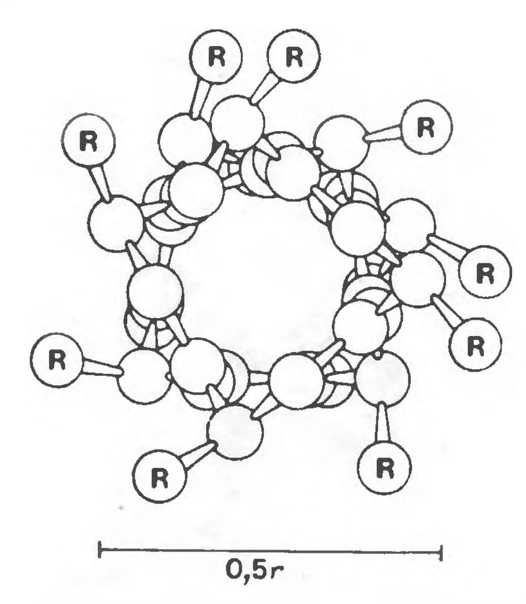


Рис. 5.4. Вид α-спирали сверху. R — боковые цепи, выступающие из спирали. Вандерваальсовы радиусы атомов значительно больше, чем это представлено на рисунке, поэтому внутри спирали почти не остается свободного пространства. (Воспроизведено с небольшими изменениями из книги Stryer L. Biochemistry, 2nd ed., Freeman, 1981. Имеется перевод: Страйер Л. Биохимия. В 3-х т.— М: Мир, 1985.)

1. α-Спираль стабилизируется водородными связями между атомом водорода, присоединенным к атому азота пептидной группы, и карбонильным кислородом остатка, отстоящего от данного вдоль цепи на четыре позиции.

2. В образовании водородной связи участвуют все пептидные группы. Это обеспечивает максимальную стабильность α-спирали.

3. В образование водородных связей вовлечены все атомы азота и кислорода пептидных групп, что в значительной мере снижает гидрофильность α-спиральных областей (и увеличивает их гидрофобность).

4. α-Спираль образуется самопроизвольно и является наиболее устойчивой конформацией полипептидной цепи, отвечающей минимуму свободной энергии.

5. В цепи из L-аминокислот правая спираль, обычно обнаруживаемая в белках, намного стабильнее левой.

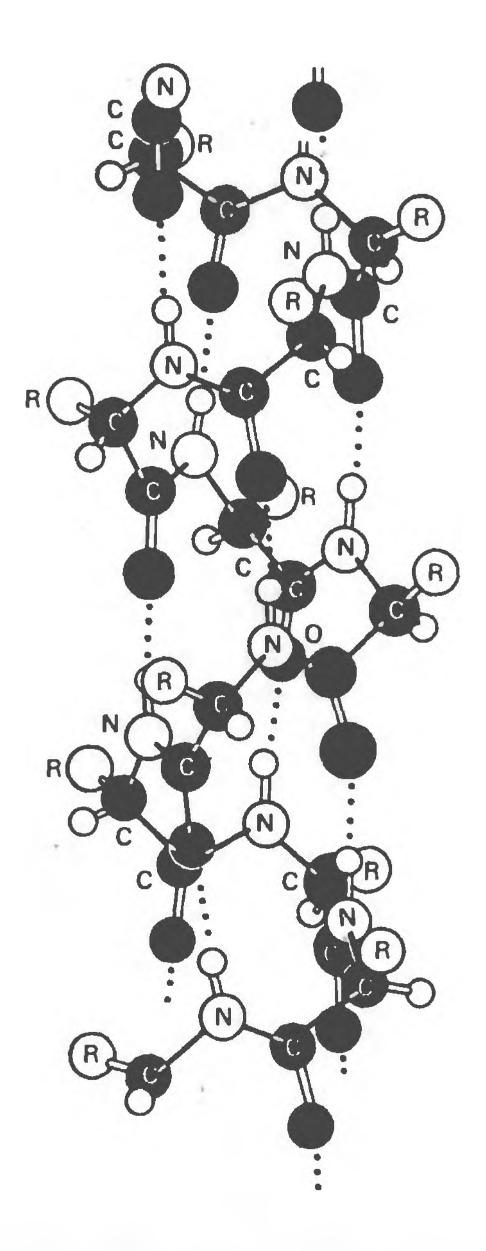


Рис. 5.5. Структура α-спирали. α-Спиральная конформация во многом определяется характером R-групп и стабилизируется водородными связями между атомами H и O (показаны пунктирными линиями). (Воспроизведено с разрешения из книги Haggis G. H. et al., Introduction to Molecular Biology, Wiley, 1964.)

Некоторые аминокислоты препятствуют свертыванию цепи в α-спираль, и в месте их расположения непрерывность α-спирали нарушается. К ним относятся пролин (в нем атом азота служит частью жесткой кольцевой структуры, и вращение вокруг связи $N—C_\alpha$ становится невозможным), а также аминокислоты с заряженными или объемными R-группами, которые электростатически или механически препятствуют формированию α-спирали (табл. 5.3).

Складчатый β-слой

Полинг и Кори предложили и другую упорядоченную структуру — складчатый β-слой (обозначение β указывало, что предложенная ими структура является второй после α-спирали). В то время как в α-спирали полипептидная цепь находится в конденсированном состоянии, в складчатом β-слое цепи почти полностью вытянуты (рис. 5.6). В тех случаях,

Таблица 5.3. Влияние различных аминокислот на формирование α-спирали

Способствуют	Дестабилизируют	Препятствуют
Ala	Arg	Pro
Asn	Asp	Hyp
Cys	Glu	
Gln	Gly	
His	Lys	
Leu	Ile	
Met	Ser	
Phe	Thr	
Irp		
Tyr		
Val		

когда соседние полипептидные цепи складчатого β-слоя идут в противоположных направлениях (за положительное принимается направление от N- к C-концу), структуру называют **антипараллельным** складчатым β-слоем (она изображена на рис. 5.6). Когда соседние цепи идут в одном направлении, структуру β-слоя называют **параллельной** (на рисунке не показана).

Области складчатой β-структуры имеются во многих белках, причем встречается и параллельная, и антипараллельная форма. В формировании таких

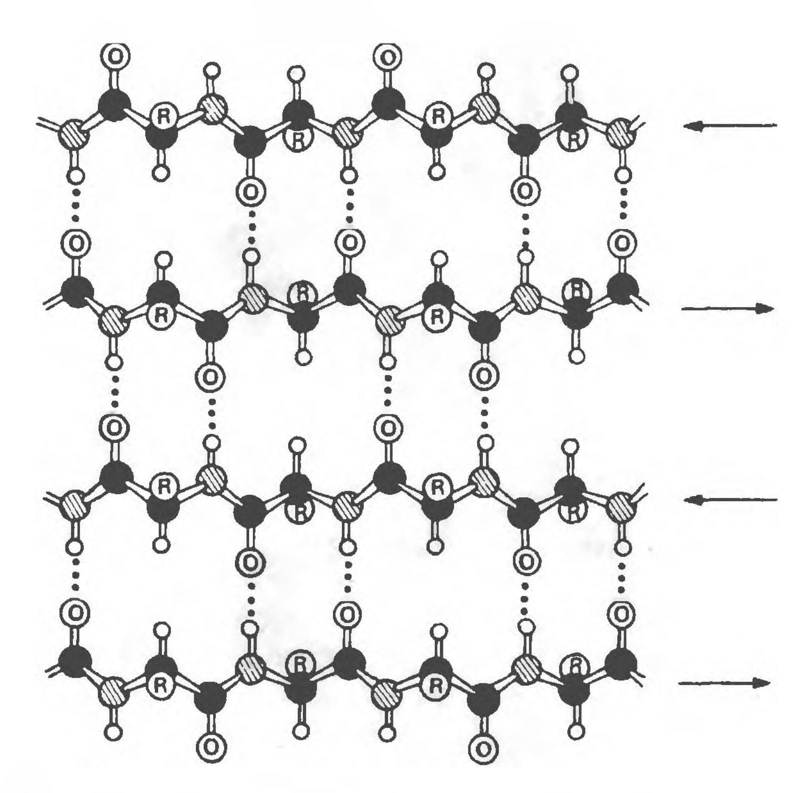


Рис. 5.6. Антипараллельный складчатый β-слой. Направление соседних цепей взаимно противоположно. Структуру стабилизируют водородные связи между NH- и CO-группами соседних цепей. Боковые группы (R) располагаются выше или ниже плоскости слоя. Черные кружки — атомы углерода, серые — атомы азота, светлые — атомы водорода. (Из книги Stryer L. Biochemistry, 2nd ed., Freeman, 1981, с изменениями.)

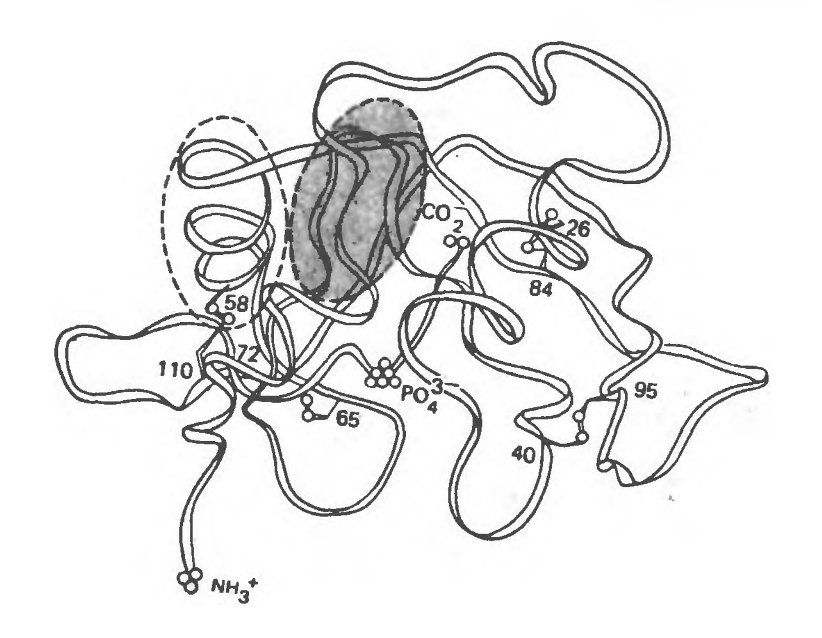


Рис. 5.7. Схематическое изображение укладки цепи в молекуле бычьей панкреатической рибонуклеазы — единой последовательности из 124 остатков. Структура стабилизирована четырьмя поперечными дисульфидными связями. Область α-спирали выделена овальным пунктирным контуром, область складчатого слоя затенена. Другие части структуры имеют нерегулярную конформацию. Локализацию активного центра (гл. 8) указывает ион PO_4^{3-}. (Из работы Kartha G., Bello J., Harker D.: Tertiary structure of ribonuclease. *Nature* 1967:**213**:862.) Этот белок удалось синтезировать чисто химическим путем.

структур могут участвовать от двух до пяти соседних полипептидных цепей. На рис. 5.7 представлен участок молекулы рибонуклеазы, в котором складчатая β-структура образована тремя участками полипептидной цепи. Во многих белках одновременно имеются и α-спирали, и складчатая β-структура (рис. 5.7).

В α-спирали стабилизирующие водородные связи образуются между пептидными группами, отстоящими одна от другой вдоль цепи на четыре остатка, а складчатая β-структура формируется благодаря образованию водородных связей между пептидами, удаленными по цепи намного дальше. Это обстоятельство также иллюстрирует рис. 5.7.

Неупорядоченная конформация (клубок)

Те участки белковой молекулы, которые не относятся к спиральным или складчатым структурам, обычно называют неупорядоченными. Как показано на рис. 5.7, в такой конформации может находиться значительная часть белковой молекулы. Термин «неупорядоченный» не вполне удачен: создается впечатление, что это указывает на меньшую биологическую значимость таких участков по сравнению с высокоупорядоченными периодическими. В то же время с точки зрения биологической функции неупорядоченные, нерегулярные участки столь же важны, как и α-спирали и складчатые β-слои.

УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

Первичная структура

Под первичной структурой, уже знакомой нам из главы о пептидах (гл. 4), понимается последовательность аминокислот в полипептидной цепи (или цепях) и положение дисульфидных связей, если они имеются.

Вторичная структура

На этом структурном уровне описываются стерические взаимосвязи между расположенными близко друг к другу вдоль цепи аминокислотами. Вторичная структура может быть регулярной (α-спираль, складчатый β-слой) или не обнаруживать никаких признаков регулярности (неупорядоченная конформация).

Третичная структура

Общее расположение, взаимную укладку различных областей, доменов и отдельных аминокислотных остатков одиночной полипептидной цепи называют третичной структурой данного белка. Четкой границы между вторичной и третичной структурами провести нельзя, однако под третичной структурой понимают стерические взаимосвязи между аминокислотными остатками, далеко отстоящими друг от друга по цепи.

Четвертичная структура

Если белки состоят из двух и более полипептидных цепей, **связанных между собой нековалентными (не пептидными и не дисульфидными)** связями, то говорят, что они обладают четвертичной структурой. Такие агрегаты стабилизируются водородными связями и электростатическими взаимодействиями между остатками, находящимися на поверхности полипептидных цепей. Подобные белки называют **олигомерами**, а составляющие их индивидуальные полипептидные цепи — **протомерами**, **мономерами** или **субъединицами.**

Многие олигомерные белки содержат два или четыре протомера и называются димерами или тетрамерами соответственно. Довольно часто встречаются олигомеры, содержащие более четырех протомеров, особенно среди регуляторных белков (пример — транскарбамоилаза). Олигомерные белки играют особую роль во внутриклеточной регуляции: их протомеры могут слегка менять взаимную ориентацию, что приводит к изменению свойств олигомера. Наиболее изученный пример — гемоглобин (гл. 16).

Роль первичной структуры в формировании более высоких уровней структурной организации белка

Вторичная и третичная структуры белка формируются самопроизвольно и определяются первичной структурой его полипептидной цепи. Параллельно синтезу цепи происходят ее локальное свертывание (образование вторичной структуры) и специфическая агрегация свернутых участков (формирование третичной структуры). Эти процессы детерминируются химическими группами, отходящими от атомов α-углерода соответствующих остатков. Например, обработка мономерного фермента рибонуклеазы мягким восстанавливающим агентом (β-меркаптоэтанолом) и денатурирующим агентом (мочевиной или гуанидином; см. ниже) приводит к инактивации белка и переходу его в неупорядоченную конформацию. Если медленно удалять денатурирующий агент и осуществлять постепенное реокисление, то вновь образуются S—S-связи и практически восстанавливается ферментативная активность. **Нет никаких оснований думать, что существует независимый генетический контроль за формированием уровней структурной организации белка выше первичного, поскольку первичная структура специфически определяет и вторичную, и третичную, и четвертичную структуру (если она имеется) — т.е. конформацию белка.** Нативной конформацией белка, в частности рибонуклеазы, по-видимому, является термодинамически наиболее устойчивая структура в данных условиях, т.е. при данных гидрофильных и гидрофобных свойствах среды.

Структура белка после его синтеза может модифицироваться (посттрансляционный процессинг); так, часто наблюдается превращение препрофермента в каталически активную форму или удаление «лидерной» последовательности, детерминирующей транспорт белков через мембраны (гл. 42).

Макромолекулярные белковые комплексы

Полифункциональные макромолекулярные комплексы, образующиеся в результате агрегации различных функциональных белков, каждый из которых обладает всеми четырьмя уровнями структурной организации, функционируют в цепи транспорта электронов (гл. 12), участвуют в биосинтезе жирных кислот (гл. 23) и метаболизме пирувата (гл. 18).

ДЕНАТУРАЦИЯ

Сравнительно слабые связи, ответственные за стабилизацию вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, легко разрушаются, что приводит к потере его биологической активности. Такое разрушение нативной структуры называют денатурацией. С физической точки зрения денатурацию можно рассматривать как разупорядочение конформации полипептидной цепи без изменения первичной структуры. Если речь идет о протомере, то процесс можно представить так, как это показано на рис. 5.8.



Рис. 5.8. Схематическое изображение денатурации протомера.

При денатурации олигомерного белка происходит диссоциация на протомеры, которая может сопровождаться или не сопровождаться изменением их конформации.

Большинство белков теряют биологическую активность в присутствии сильных минеральных кислот или оснований, при нагревании и обработке ионными детергентами (амфифильными соединениями), хаотропными агентами (мочевиной, гуанидином), тяжелыми металлами (Ag, Pb, Hg) или органическими растворителями. Денатурированные белки обычно менее растворимы в воде и часто из водного раствора выпадают в осадок. Это свойство широко используется в клинической лаборатории. Пробы крови или сыворотки, взятые для анализа на содержание в них малых молекул (глюкозы, мочевой кислоты, лекарственных препаратов), сначала обрабатывают трихлоруксусной, фосфовольфрамовой или фосфомолибденовой кислотой для осаждения белка. Осадок удаляют центрифугированием, а свободную от белка надосадочную жидкость анализируют.

Чувствительность большинства ферментов к нагреванию, кислотам и протеазам позволяет провести предварительное тестирование на ферментативный характер реакции. Если клеточный экстракт обладает каталитической активностью и теряет ее после кипячения, подкисления среды и последующей ее нейтрализации или после обработки какой-либо протеазой, то можно предположить, что катализатором служит фермент.

Часто на процесс денатурации оказывает влияние присутствие субстрата. Этот эффект объясняют конформационными изменениями фермента, сопровождающими связывание субстрата. Новая конформация может быть более стабильна или менее стабильна, чем исходная.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Сначала сложные белки освобождают от простетических групп (например, от гема) и окисляют дисульфидные группы; в результате образуются линей-

Таблица 5.4. Модификация групп α-COOH и α-NH_2, находящихся в составе белков[1]

α-COOH	α-NH_2		
Амид	N-формил	N-ацетил	N-метил
		Ala	Ala
Asp		Asp	Asp
Glu			
Gly	Gly	Gly	Gly
His			
Met	Met	Met	Met
Phe			
Pro			
		Ser	Ser
		Thr	Thr
Tyr			
Val		Val	

[1] С изменениями, из работы Uy R., Wold F.: Posttranslational covalent modification of proteins. *Science*: 1977: **198**: 890, с любезного разрешения авторов.

ные полипептиды (см. рис. 4.10). Методы секвенирования этих полипептидов уже обсуждались в гл. 4. Большинство белков содержит только те аминокислоты, которые перечислены в табл. 3.3, однако в некоторых белках встречаются производные этих аминокислот (табл. 5.4 и 5.5). Методы идентификации производных аминокислот выходят за рамки данной главы; отметим только, что их присутствие усложняет определение первичной структуры.

Первичная структура инсулина и рибонуклеазы

Инсулин состоит из двух полипептидных цепей, ковалентно связанных дисульфидными связями (рис. 5.9). В А-цепи на N-конце находится остаток Gly, а на С-конце — Asn; в В-цепи N- и С-концевыми остатками являются Phe и Ala соответственно. При окислении инсулина надмуравьиной кислотой дисульфидные связи между А- и В-цепями разрываются. В ходе биосинтеза обе цепи вначале находятся в составе одной полипептидной цепи **проинсулина**, который после синтеза подвергается протеолитическому процессингу, ведущему к образованию инсулина (гл. 51).

Таблица 5.5. Модифицируемые функциональные группы в боковых цепях аминокислот в составе белков[1]

—OH	—N (в боковой цепи)		
PO_3H_2	N-метил	N-диметил	N-триметил
	Arg	Arg	
	His		
	Lys	Lys	Lys
Ser			
Thr			
Tyr			

[1] С изменениями, из работы Uy R., Wold F.: Posttranslational covalent modification of proteins. *Science*: 1977: **198**: 890, с любезного разрешения авторов.

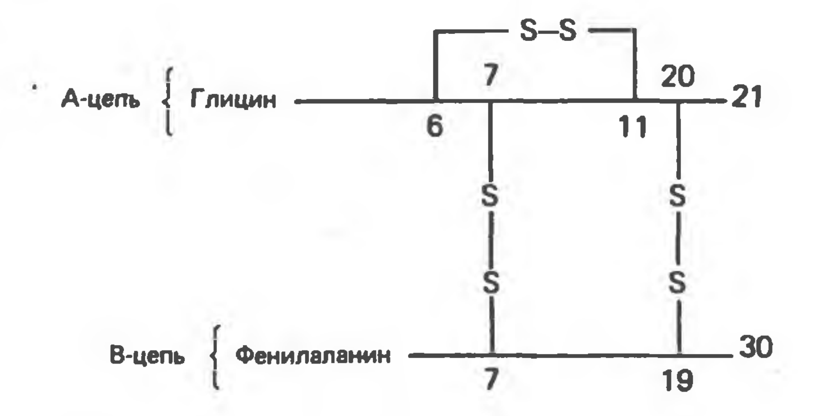


Рис. 5.9. А- и В-цепи инсулина человека, соединенные дисульфидными связями.

Рибонуклеаза состоит из одиночной цепи длиной 124 остатка, с Lys на N-конце и Val на С-конце. Восемь остатков цистеина соединены дисульфидными связями, так что в белке образуются четыре поперечные связи (рис. 5.10).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ И ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОВСКОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ

Ранее для выявления спиральных структур в белках широко использовались такие методы, как дисперсия оптического вращения и тритиевый обмен лабильных протонов; в дальнейшем все эти методы были вытеснены гораздо более мощным методом рентгеновской кристаллографии. В этом случае необходимо получить белок в кристаллическом виде. Кроме того, нужно, как правило, иметь еще и кристалл производиого этого же белка, содержащего ионы тяжелых металлов. Рентгеновские лучи, про-

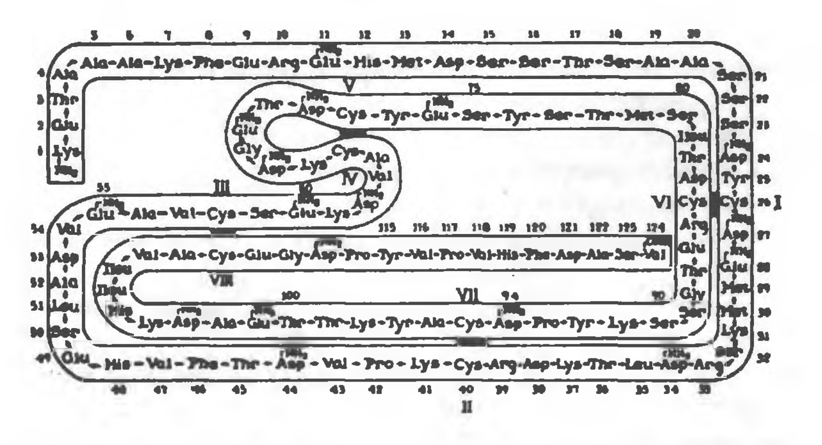


Рис. 5.10. Структура бычьей рибонуклеазы. Последовательность аминокислотных остатков представлена в виде двумерной схемы: изображены дисульфидные связи. Стрелки указывают направление пептидной цепи, начиная с N-конца. (Из работы Smyth D. G., Stein W. H., Moore S.: The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease. Revisions and conformations. *J. Biol. Chem.* 1963:**238**:227, с любезного разрешения.)

ходя через кристалл, рассеиваются, причем распределение интенсивности рассеяния зависит от распределения электронной плотности в кристалле. Распределение интенсивностей регистрируют с помощью фотографической пленки и расчетным путем получают карты электронной плотности. По этим картам (в виде плоских сечений), наложенным друг на друга, получают достаточно достоверную модель рассматриваемого белка. Рентгеновская кристаллография является дорогостоящим методом, требует больших затрат времени и солидного профессионального опыта, но в итоге она позволяет получить очень подробную и точную картину взаимной ориентации всех аминокислот во многих белках. Ее вклад в наши сегодняшние представления о структуре белка трудно переоценить.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Определение четвертичной структуры олигомерных белков включает идентификацию протомеров каждого типа, определение их взаимной ориентации и изучение взаимодействий, стабилизирующих всю структуру.

Для определения молекулярной массы олигомера пригодны многие из применяемых для этой цели методов, лишь бы они не приводили к денатурации олигомера. Если же предварительно провести денатурацию олигомера, то можно теми же методами определить молекулярную массу протомера.

Ультрацентрифугирование

Этот метод, разработанный Сведбергом, основан на измерении скорости седиментации (осаждения) под действием центробежных сил, которые создаются в ультрацентрифуге при ускорении порядка $10^5 g$.

Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы

Набор белковых стандартов и исследуемый белок наслаивают поверх налитого в пластмассовую пробирку раствора сахарозы, плотность которого изменяется так, что образуется градиент концентраций от 5 до 20%; далее в течение ночи проводят центрифугирование при $\sim 10^5 g$. После этого дно пробирки прокалывают иголкой, содержимое собирают по каплям в небольшие пробирки, устанавливают относительное положение белков вдоль градиента плотности и проводят необходимые расчеты.

Фильтрация через молекулярные сита

Вначале проводят калибровку колонки с сефадексом или сходным наполнителем, используя набор белков известной молекулярной массы. Затем оценивают молекулярную массу неизвестного белка, сравнивая его подвижность с подвижностью стандартов. Однако, если белок представляет собой высокоасимметричную молекулу или же взаимодействует с на-

Таблица 5.6. Четвертичная структура некоторых ферментов[1]

Фермент (олигомер)	Число протомеров	Молекулярная масса протомера
Аспартат-трансаминаза из сердца курицы (L-аспартат: 2-кетоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1)	2	50 000
Синтаза жирных кислот из печени голубя	2	230 000
Фруктозо-бисфосфатаза из печени кролика (D-фруктозо-1,6-бисфосфат-1-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.11)	2[2] 2[2]	29 000 37 000
Орнитинтрансаминаза из печени крысы (L-орнитин:2-кетокислота—аминотрансфераза, КФ 2.6.1.13)	4	33 000
Пропионил-СоА-карбоксилаза из сердца свиньи (пропионил-СоА:CO_2 лигаза [ADP], КФ 6.4.1.3)	4	175 000
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) из сердца, печени или мышцы быка (L-лактат: NAD оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27)	4[2]	35 000
Митохондриальная АТРаза из сердца быка (АТР-фосфогидролаза, КФ 3.6.1.3)	10	26 000
Глутаминсинтаза из *E. coli* (L-глутамат: NH_3 лигаза [ADP], КФ 6.3.1.2)	12	48 500
Ацетил-СоА-карбоксилаза из печени курицы (ацетил-СоА : CO_2 лигаза [ADP], КФ 6.4.1.2)	2[2] 10[2]	4 100 000 409 000

[1] Из обзора Klotz I.M., Langerman N.R., Darnall D.W.: Quaternary structure of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1970:**39**:25.
[2] Неидентичные субъединицы.

полнителем (молекулярным ситом), могут возникать серьезные ошибки.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Набор стандартных белков разделяют с помощью электрофореза в гелях различной пористости с содержанием поперечных сшивок 5—15%. Выявляют белок, окрашивая его кумасси синим или серебром, и определяют молекулярную массу, сравнивая подвижность белка и стандарта. Особенно широкое применение этот метод нашел при определении молекулярной массы протомера; сначала осуществляют денатурацию олигомера (например, кипячением в детергенте в присутствии β-меркаптоэтанола), а затем проводят разделение в гелях, содержащих ионный детергент — додецилсульфат натрия.

Электронная микроскопия

С помощью электронного микроскопа можно получать изображения малых объектов при линейном увеличении в 100 000 раз. Это открывает возможность визуализации высокомолекулярных белков в составе вирусных частиц, ферментных комплексов, олигомерных белков.

В табл. 5.6 приведены выборочные данные о числе и молекулярной массе протомеров, из которых формируется четвертичная структура ряда ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

Advances in Protein Chemistry, Academic Press, 1944—1987. (Ежегодник.)

Aisen P., Listowsky I. Iron transport and storage proteins, Annu. Rev. Biochem., 1980, 49, 357.

Baldwin R. L. Intermediates in protein folding, Annu. Rev. Biochem., 1975, **44**,453.

Chou P. Y., Fassman G. D. Empirical predictions of protein structure, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 251.

Croft L. R. Handbook of Amino Acid Sequences of Proteins, Joynson-Bruvvers Ltd. (Oxford, England), 1973.

Gurd F. N., Rothgeb T. M. Motions in proteins, Adv. Protein Chem., 1979, **33**, 74.

Haschemeyer R. H., deHarven E. Electron microscopy of enzymes, Annu. Rev. Biochem., 1974, **43**, 279.

Lennarz W. J. (ed.) The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum Press, 1980.

Lijas A., Rossman M. G. X-ray studies of protein interactions, Annu. Rev. Biochem., 1974, **43**, 475.

Neurath H., Hill R. L. (ed.) The Proteins, 3rd ed., Academic Press, 1975.

Osborne J. C. Jr., Brewer H. B. Jr. The plasma lipoproteins, Adv. Protein Chem., 1977, **31**, 253.

Smith L. C., Pownall H. J., Gotto A. M. Jr. The plasma lipoproteins: Structure and metabolism, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 751.

Глава 6

Белки: миоглобин и гемоглобин

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Белки, о которых здесь пойдет речь, имеют кардинальное биологическое значение. Очень важно и то, что на их примере можно проследить взаимосвязь между структурой белков и их биологическими функциями.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гемсодержащие белки участвуют в процессах связывания и транспорта кислорода, в транспорте электронов и фотосинтезе. Детальное изучение гемоглобина и миоглобина выявляет ряд структурных аспектов, общих для многих белков. Говоря о большом биомедицинском значении этих белков, мы имеем в виду, что результаты, полученные при их исследовании, наглядно иллюстрируют структурно-функциональные взаимосвязи. Кроме того, эти исследования выявляют молекулярную основу ряда генетических болезней, таких, как серповидноклеточная анемия (возникающая в результате изменения свойств поверхности β-субъединицы гемоглобина) или талассемия (хроническое наследуемое гемолитическое заболевание, характеризующееся нарушениями процессов синтеза гемоглобина). Летальный эффект цианида и окиси углерода объясняется тем, что эти вещества блокируют физиологическую функцию гемопротеинов — цитохромоксидазы и гемоглобина соответственно. Наконец, стабилизация четвертичной структуры дезоксигемоглобина 2,3-бисфосфоглицератом (ДФГ) занимает центральное место в исследовании механизмов кислородной недостаточности в условиях высокогорья и процессов адаптации к этим условиям.

ГЕМОПРОТЕИНЫ — МИОГЛОБИН И ГЕМОГЛОБИН

На примере миоглобина и гемоглобина очень четко прослеживается связь между структурой и функцией белков вообще и глобулярных белков в особенности. Эти два сложных белка содержат в качестве простетической группы **гем — циклический тетрапиррол**, присутствием которого объясняется и красный цвет этих белков, и их способность запасать кислород (миоглобин) и обеспечивать его транспорт (гемоглобин). Тетрапирролы состоят из четырех молекул пиррола (рис. 6.1), связанных четырьмя α-метиленовыми мостиками с образованием плоской кольцевой структуры. Что при этом образуется — гем или какое-то родственное соединение — зависит от природы β-заместителей в пиррольных кольцах. Замещающими группами в геме являются метильная (М), винильная (V) и пропионатная (Pr) группы, расположенные в таком порядке: М, V, М, V, М, Pr, Pr, М (рис. 6.2). В центре плоского кольца находится один атом железа в ферро-состоянии (Fe^{2+}). Тетрапиррольные простетические группы и связанные с ними ионы металлов содержат и другие белки: цитохромы (Fe^{2+} и Fe^{3+}), некоторые ферменты, например каталаза, триптофанпирролаза, и хлорофиллсодержащие белки (Mg^{2+}). В цитохромах происходит попеременное окисление и восстановление атома железа, играющее определяющую роль в их функционировании (транспорт электронов; см. гл. 12). Напротив, **в миоглобине и гемоглобине окисление Fe^{2+} приводит к потере их биологической активности.**

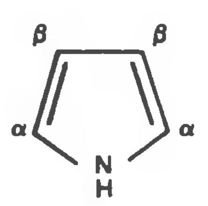


Рис. 6.1. Пиррол. Атомы α-углерода соединены метиленовыми мостиками с образованием тетрапиррола. При атомах β-углерода находятся заместители, характерные для того или иного тетрапиррола, в частности гема.

Рис. 6.2. Гем. Пиррольные кольца и атомы углерода, участвующие в образовании метиленовых мостиков, находятся в одной плоскости; почти не выходит из этой плоскости и атом железа (Fe^{2+}). Пятое и шестое координационные положения находятся выше и ниже плоскости гемового кольца на линии, перпендикулярной плоскости. Обратите внимание на природу заместителей при β-атомах углерода пиррольных колец: полярная часть гема в молекуле миоглобина обращена в сторону ее поверхности (на рисунке — слева внизу).

МИОГЛОБИН

Биологическая функция миоглобина

Миоглобин содержится в красных мышцах и участвует в запасании кислорода. В условиях кислородного голодания (например, при сильной физической нагрузке) кислород высвобождается из комплекса с миоглобином и поступает в митохондрии мышечных клеток, где осуществляется синтез ATP (окислительное фосфорилирование; см. гл. 13).

Первичная структура и распределение аминокислот

Миоглобин состоит из единичной полипептидной цепи с мол. массой 17000; никаких особенностей в характере составляющих его 153 аминокислотных остатков не обнаруживается. При анализе же их пространственного распределения четко выявляется одна особенность: **на поверхности молекулы находятся полярные остатки, а внутри структуры — неполярные**; это свойство характерно для глобулярных белков. Остатки, содержащие одновременно и полярные, и неполярные группы (например, Thr, Trp и Tyr), расположены так, что неполярные группы ориентируются внутрь глобулы. Если не считать двух остатков гистидина, принимающих участие в связывании кислорода, **то внутренние области миоглобина содержат только неполярные остатки** (например, Leu, Val, Phe, Met).

Вторичная и третичная структура миоглобина

Как показывает рентгеноструктурный анализ, миоглобин представляет собой компактную, примерно сферическую молекулу размером 4,5 × 3,5 × 2,5 нм (рис. 6.3). Примерно 75% остатков образуют восемь правых α-спиралей, содержащих от 7 до 20 остатков. Начиная с N-конца, спирали обозначают буквами от A до H. Участки, соединяющие спирали, обозначают двумя буквами, указывающими соответствующие спирали. Индивидуальным остаткам присваивают букву, указывающую спираль, в которой они находятся, и порядковый номер, отсчитываемый от N-конца спирали. Например, His F8 — восьмой остаток в спирали F, им является гистидин. Остатки, далеко отстоящие друг от друга вдоль цепи (например, принадлежащие разным спиралям), могут быть пространственно сближены; например, довольно близко находятся остатки гистидина F8 (проксимальный) и E7 (дистальный) (рис. 6.3).

Ряд данных свидетельствует о том, что в растворе вторичная и третичная структуры миоглобина

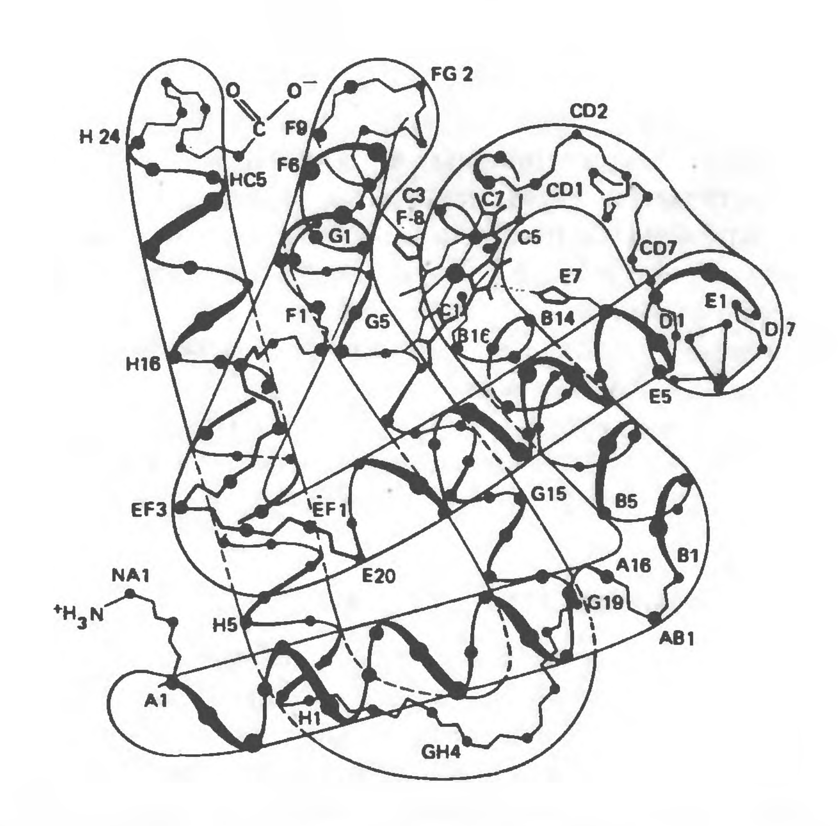


Рис. 6.3. Модель молекулы миоглобина. Контуры — это очертания, наблюдаемые при низком разрешении. Изображены в основном только атомы α-углерода и гем. (Из статьи Dickerson R. E. In: The Proteins, 2nd ed., Vol. 2. Neurath H. (editor). Academic Press, 1964, с любезного разрешения.)

близки к структуре кристаллического миоглобина. В обоих случаях наблюдаются практически идентичные спектры поглощения; кристаллический миоглобин связывает кислород; содержание α-спиралей в растворе, оцениваемое по дисперсии оптического вращения и круговому дихроизму, сходно с данными, полученными методом рентгеноструктурного анализа.

Влияние гема на конформацию миоглобина

При понижении pH до 3,5 образуется апомиоглобин (миоглобин, не содержащий гема), и содержание α-спиралей резко падает, а последующее добавление мочевины к апомиоглобину при нейтральном pH приводит к почти полному их исчезновению. Последующее удаление мочевины диализом и добавление гема полностью восстанавливает число α-спиралей, а добавление Fe^{2+} приводит к полному восстановлению биологической (кислородсвязывающей) активности. Таким образом, информация, содержащаяся в первичной структуре апомиоглобина, в присутствии гема однозначно детерминирует свертывание молекулы белка с образованием нативной, биологически активной конформации. Это важное положение распространяется и на другие белки: **первичная структура белка определяет его вторичную и третичную структуру.**

Пространственная ориентация атома железа, проксимального и дистального остатков гистидина в молекуле миоглобина

Гем в молекуле миоглобина расположен в щели между спиралями E и F; его полярные пропионатные группы ориентированы к поверхности глобулы, а остальная часть находится внутри структуры и окружена неполярными остатками, за исключением His F8 и His F7. Пятое координационное положение атома железа занято атомом азота гетероциклического кольца **проксимального гистидина** His F8 (рис. 6.4). **Дистальный гистидин** (His E7) расположен по другую сторону гемового кольца, почти напротив His F8, но шестое координационное положение атома железа His E7 остается свободным (рис. 6.4).

Расположение атома железа

В неоксигенированном миоглобине атом железа на 0,03 нм выступает из плоскости кольца в направлении His F8. В оксигенированном миоглобине атом кислорода занимает шестое координационное положение атома железа, а сам атом железа выступает из плоскости гема только на 0,01 нм. Таким образом, оксигенирование миоглобина сопровождается смещением атома железа и, следовательно, His F8 и ковалентно связанных с ним остатков в направлении плоскости кольца; в результате эта область белковой глобулы принимает новую конформацию.

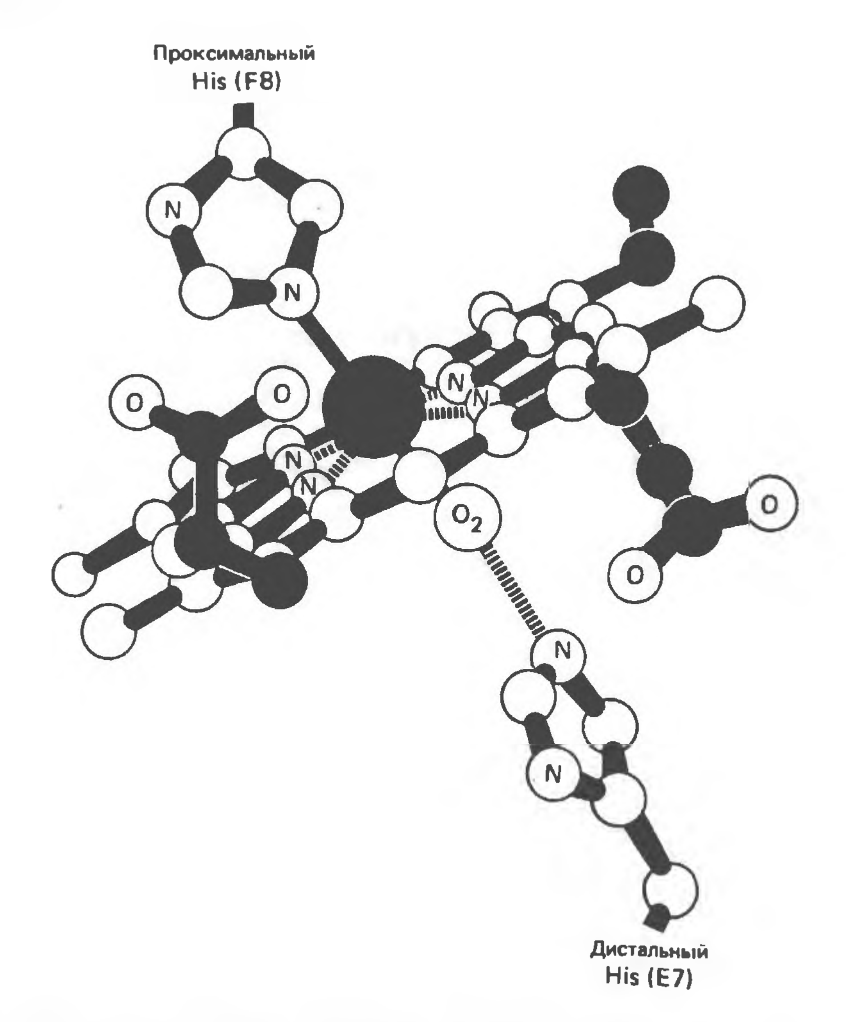


Рис. 6.4. Положение молекулы кислорода в геме после оксигенирования. Изображены также имидазольные кольца двух важных остатков гистидина в глобиновой цепи, которые располагаются рядом с атомом железа. (Из работы Harper H. A. et al., Physiológische Chemie. Springer-Verlag, 1975, с любезного разрешения.)

Лиганды

Связь, образующаяся между атомом кислорода и атомом Fe^{2+}, при оксигенировании миоглобина направлена перпендикулярно плоскости кольца гема. Второй атом кислорода удален от дистального гистидина, и связь между атомами кислорода образует относительно плоскости гема угол 121° (рис. 6.5).

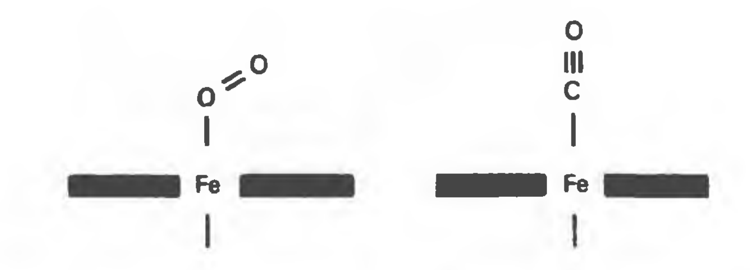


Рис. 6.5. Предпочтительные ориентации молекул кислорода и окиси углерода, связанных с атомом железа изолированного гема (темные полоски).

· Окись углерода (CO) связывается с изолированным гемом примерно в 25 000 раз более прочно, чем кислород. Поскольку атмосферный воздух содержит следы CO и еще небольшое количество CO образуется в ходе нормального катаболизма гема, возникает вопрос: почему же шестое координационное положение железа в миоглобине занято не CO, а молекулой O_2? Связано это со **стерическими ограничениями, возникающими в миоглобине.** Молекула CO, связываясь с гемом, стремится принять такую ориентацию, при которой все три атома (Fe, C, O) находятся вдоль линии, перпендикулярной плоскости кольца гема (рис. 6.6). Для изолированного гема такая ориентация вполне возможна, но в миоглобине **связыванию CO в такой ориентации стерически препятствует дистальный гистидин** (рис. 6.6). Поэтому CO связывается в менее благоприятной конфигурации, что понижает прочность связи CO с гемом более чем на два порядка, так что она становится всего лишь в 200 раз прочнее, чем связь гем — O_2. Тем не менее небольшая часть молекул миоглобина (около 1%) в нормальных условиях связывает CO.

Кинетика оксигенирования миоглобина

Почему миоглобин неспособен транспортировать кислород, но зато эффективно его запасает? Количество кислорода, связывающегося с миоглобином («процент насыщения»), зависит от концентрации кислорода в среде, непосредственно окружающей молекулу белка (эту концентрацию выражают как P_{O_2} — парциальное давление кислорода). Зависимость между количеством связанного кислорода и P_{O_2} можно представить графически в виде кривой насыщения миоглобина кислородом (кривой диссоциации кислорода). **Для миоглобина изотерма адсорбции кислорода имеет форму гиперболы** (рис. 6.7).

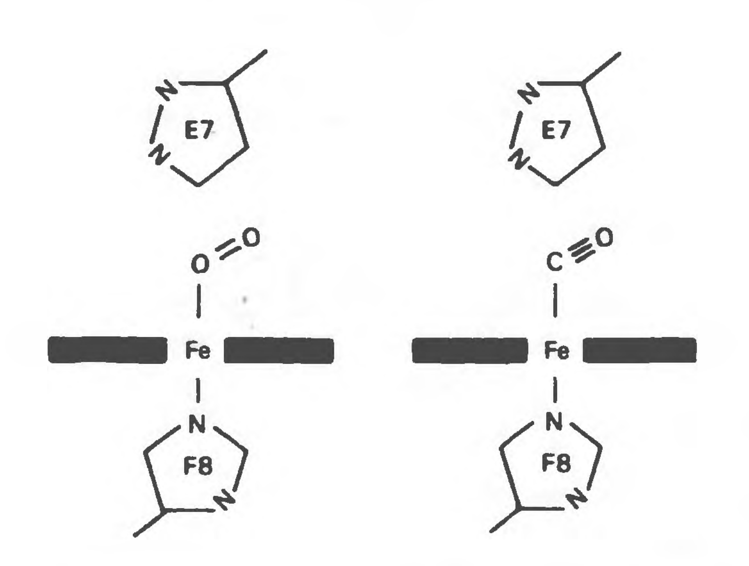


Рис. 6.6. Ориентация молекул кислорода и окиси углерода, связанных с атомом железа гема в составе миоглобина. Дистальный гистидин E7 препятствует связыванию CO в предпочтительной для этой молекулы ориентации — под углом 90° к плоскости гемового кольца.

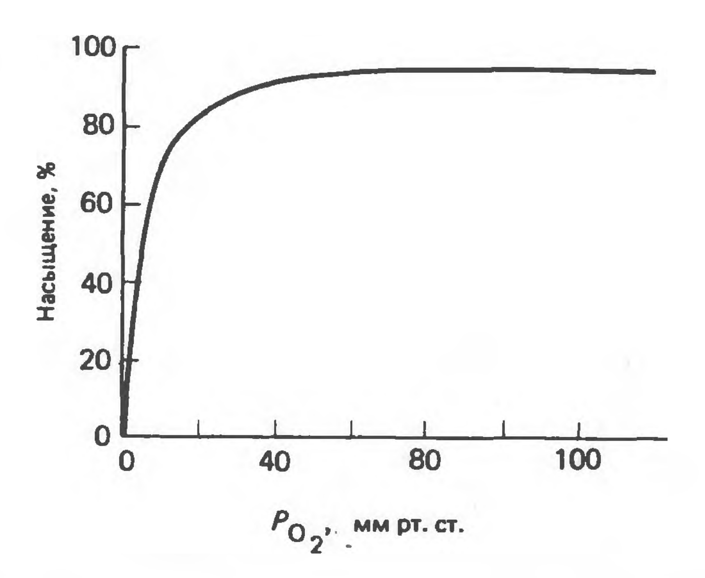


Рис. 6.7. Кривая насыщения миоглобина кислородом.

P_{O_2} в ткани, окружающей легочные капилляры, составляет 100 мм рт. ст., поэтому миоглобин в легких мог бы весьма эффективно насыщаться кислородом. В венозной крови P_{O_2} равно 40 мм рт. ст., а в активно работающей мышце — около 20 мм рт. ст. Но даже при парциальном давлении 20 мм рт. ст. степень насыщения миоглобина кислородом будет весьма значительной, и поэтому миоглобин не может служить средством его доставки от легких к периферическим тканям. Однако при кислородном голодании, которым сопровождается тяжелая физическая работа, P_{O_2} в мышечной ткани может понизиться и до 5 мм рт. ст.; при столь низком давлении миоглобин легко отдает связанный кислород, обеспечивая тем самым окислительный синтез ATP в митохондриях мышечных клеток.

ГЕМОГЛОБИНЫ

Биологическая функция гемоглобинов

Гемоглобины — структурно-родственные белки, находящиеся в эритроцитах позвоночных. Они выполняют две важные биологические функции: 1) переносят O_2 из легких к периферическим тканям; 2) переносят CO_2 и протоны от периферических тканей к дыхательным органам для последующего выведения из организма. Сравнительная биохимия гемоглобинов чрезвычайно интересна сама по себе, однако мы здесь сосредоточим внимание только на гемоглобинах человека.

Первичная структура гемоглобина A

В отличие от миоглобина, который не имеет четвертичной структуры, гемоглобины представляют собой тетрамерные белки, молекулы которых образованы различными типами полипептидных цепей (они обозначаются α, β, γ, δ, S и т. д.). В состав молекулы входят по две цепи двух разных типов. Длина

α- и β-цепей примерно одинакова — α-цепь содержит 141 остаток, а β-цепь — 146; однако α- и β-полипептиды гемоглобина А (HbA) кодируются разными генами и имеют разную первичную структуру. В то же время первичная структура β-, γ- и δ-цепей гемоглобина человека в значительной степени консервативна.

Вторичная и третичная структура гемоглобина А

Несмотря на различия в длине цепи и аминокислотной последовательности миоглобина и β-полипептида HbA, они имеют почти идентичную вторичную и третичную структуру. Это поразительное сходство, которое распространяется на расположение гема и восьми спиральных участков, частично обусловлено тем, что в эквивалентных положениях первичной структуры миоглобина и β-субъединицы HbA находятся хотя и различающиеся, но сходные по своим свойствам аминокислоты. α-Полипептид также весьма сходен с миоглобином, хотя в нем содержится семь, а не восемь спиралей. Как и в миоглобине, гидрофобные остатки у него размещаются внутри структуры, а гидрофильные (опять-таки за исключением двух остатков гистидина) — на поверхности; это в одинаковой мере свойственно и α-, и β-субъединицам.

Четвертичная структура гемоглобина А

Свойства индивидуальных гемоглобинов неразрывно связаны с их четвертичной, равно как и вторичной и третичной, структурами. Наиболее распространенные гемоглобины имеют следующую тетрамерную структуру: HbA (нормальный гемоглобин взрослого человека) — $\alpha_2\beta_2$; HbF (фетальный гемоглобин) — $\alpha_2\gamma_2$; HbS (гемоглобин при серповидноклеточной анемии) — α_2S_2; HbA_2 (минорный гемоглобин взрослого человека) — $\alpha_2\delta_2$. Четвертичная структура наделяет гемоглобин дополнительными важными особенностями (отсутствующими у миоглобина), которые способствуют выполнению гемоглобином его уникальной биологической функции и обеспечивают возможность строгой регуляции его свойств. Гемоглобин обладает **аллостерическими свойствами** (от греч. *аллос* — другой, *стерос* — место, пространство), и на его примере можно лучше понять свойства других аллостерических белков.

Кинетика оксигенирования гемоглобина

Гемоглобин связывает четыре **молекулы** кислорода на тетрамер (по одной на гем в каждой субъединице); особенно важным отличием его от миоглобина является характерная кривая насыщения кислородом, которая имеет сигмоидную форму (рис. 6.8). Таким образом, способность гемоглобина связывать O_2 зависит от того, содержатся ли в данном тетрамере другие молекулы O_2. Если да, то последующие молекулы O_2 присоединяются легче. Следовательно, для гемоглобина характерна **кинетика кооперативного связывания**, благодаря которой он связывает максимальное количество O_2 в легких и отдает максимальное количество O_2 при тех P_{O_2}, которые имеют место в периферических тканях. Сравните, например, какие количества кислорода связываются гемоглобином и миоглобином в легких, при P_{O_2} = 100 мм рт. ст., и какие в тканях, при P_{O_2} = 20 мм рт. ст. (рис. 6.8).

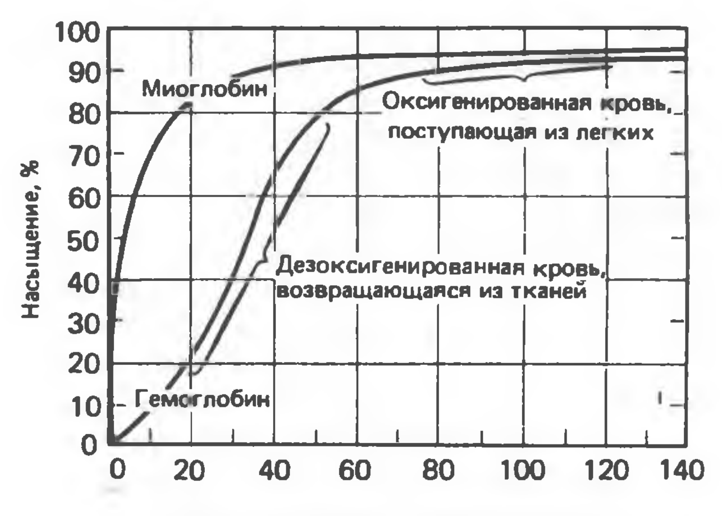


Рис. 6.8. Кривые связывания кислорода гемоглобином и миоглобином. Парциальное давление кислорода в артериальной крови составляет около 100 мм рт. ст., в венозной крови — около 40 мм рт. ст., в капиллярах кровеносных сосудов активной мышцы — около 20 мм рт. ст.; минимальное давление, необходимое для функционирования ферментов цитохромной системы, равно ~5 мм рт. ст. Из рисунка видно, что ассоциация цепей с образованием тетрамерной структуры приводит к существенному повышению эффективности снабжения тканей кислородом по сравнению с мономерными белками. (Изолированные цепи гемоглобина обладают примерно таким же сродством к кислороду, что и миоглобин, и характеризуются аналогичной гиперболической кривой насыщения.) (Из работы Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (editors): The Metabolic Basis of Inherited Diseases. 4th ed. McGraw-Hill, 1978, с изменениями.)

Сродство гемоглобинов к O_2 характеризуется величиной P_{50} — **значением P_{O_2}, при котором наблюдается полунасыщение гемоглобина кислородом.** Значение P_{50} у разных организмов существенно различается, но во всех случаях оно превышает значение P_{O_2} в периферических тканях рассматриваемого организма. Это хорошо иллюстрирует фетальный гемоглобин человека (HBF). Для HbA P_{50} = 26 мм. рт. ст., а для HBF P_{50} = 20 мм рт. ст. Благодаря этой разнице гемоглобин F отбирает кислород у HbA, находящегося в плацентарной крови. Однако после рождения ребенка HBF утрачивает свою функцию; обладая более высоким сродством к O_2, он высвобождает меньшее его количество в тканях.

Оксигенирование сопровождается значительными конформационными изменениями в гемоглобине

Связывание O_2 сопровождается разрывом солевых связей, образованных концевыми карбоксильными группами субъединиц (рис. 6.9). Это облегчает связывание следующих молекул O_2, поскольку при этом требуется разрыв меньшего числа солевых связей. Указанные изменения заметно влияют на вторичную, третичную и особенно четвертичную структуру гемоглобина. При этом одна α/β-пара субъединиц поворачивается относительно другой α/β-пары, что приводит к компактизации тетрамера и повышению сродства гемов к O_2 (рис. 6.10 и 6.11).

Четвертичная структура частично оксигенированного гемоглобина описывается как Т-состояние (от англ. *taut* — напряжение); полностью оксигенированному гемоглобину (HbO_2) отвечает R-состояние (*relaxed* — релаксированное) (рис. 6.12). Термины R- и Т-состояния используют для характеристики четвертичной структуры аллостерических ферментов; меньшим сродством к субстрату обладает Т-состояние.

Конформационные изменения в окружении гемогруппы

Оксигенирование гемоглобина, как и миоглобина, сопровождается структурными изменениями в окружении гемогруппы. При оксигенировании атом железа, который в дезоксигемоглобине выступал на 0,06 нм из плоскости гемового кольца, втягивается в эту плоскость (рис. 6.13). Вслед за атомом железа ближе к гему перемещается и проксимальный

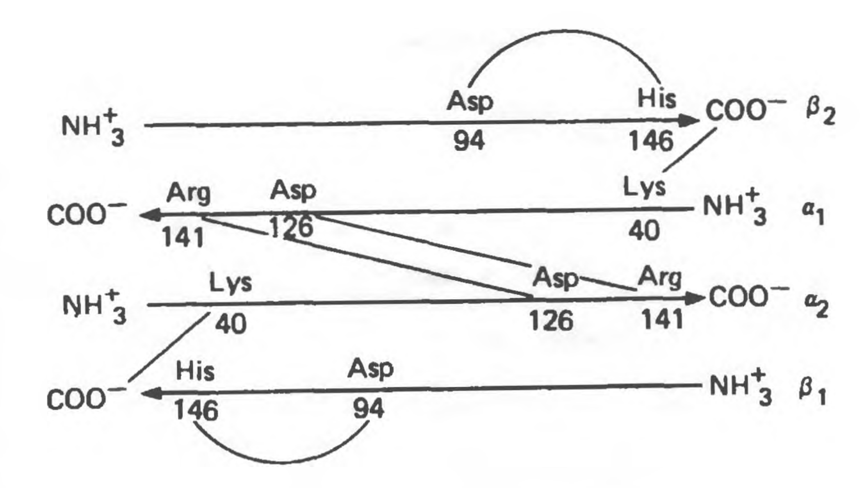


Рис. 6.9. Солевые связи между субъединицами в дезоксигемоглобине. При оксигенировании эти нековалентные связи, обусловленные электростатическими взаимодействиями, разрушаются. (Из книги Stryer L.: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, 1981, с изменениями.)

гистидин (F8), а также связанные с ним соседние остатки.

Транспорт двуокиси углерода

Гемоглобин не только переносит кислород от легких к периферическим тканям, но и ускоряет **транспорт CO_2** от тканей к легким. Гемоглобин связывает CO_2 сразу после высвобождения кислорода; примерно 15% CO_2, присутствующего в крови, переносится молекулами гемоглобина. Находящаяся в эритроцитах карбоангидраза катализирует превращение поступающего из тканей CO_2 в угольную кислоту (рис. 6.14). Угольная кислота быстро диссоциирует на бикарбонат-ион и протон, причем равновесие сдвинуто в сторону диссоциации. Для

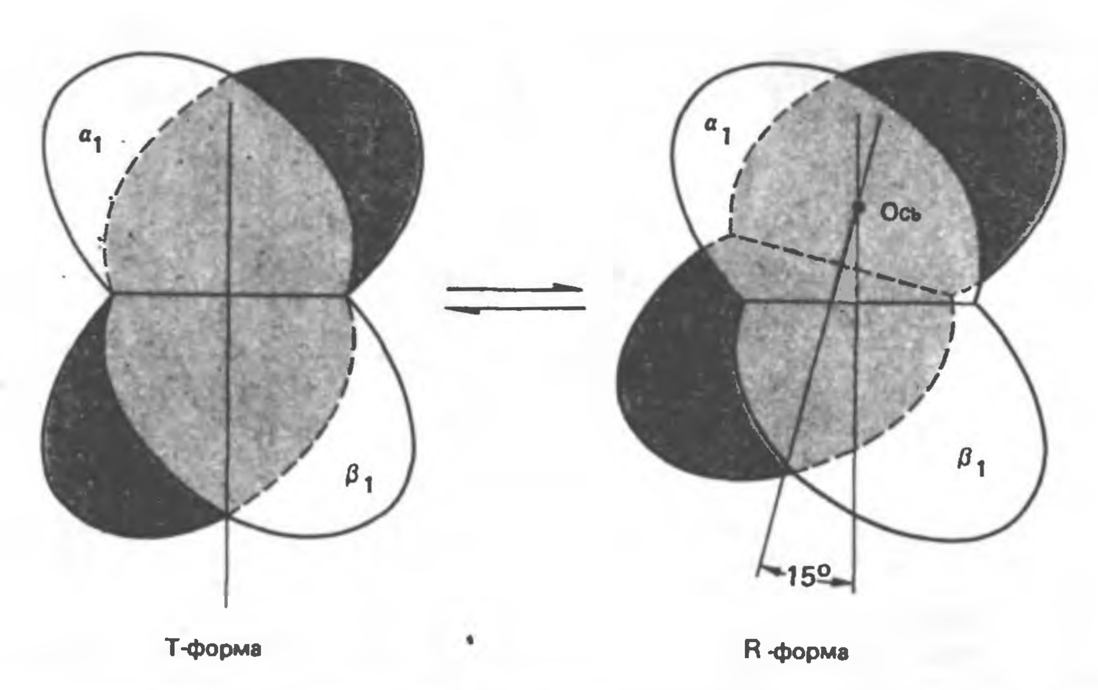


Рис. 6.10. Переход гемоглобина из Т- в R-форму сопровождается поворотом одной пары жестко связанных субъединиц (α_2/β_2) на 15° относительно другой такой же пары (α_1/β_1). Ось вращения эксцентрична, т. е. одновременно происходит сдвиг димера (α_2/β_2) ближе к оси тетрамера. На этом рисунке показан поворот и смещение затененной α_2/β_2-пары относительно незатененной α_1/β_1-пары (последняя считается неподвижной).

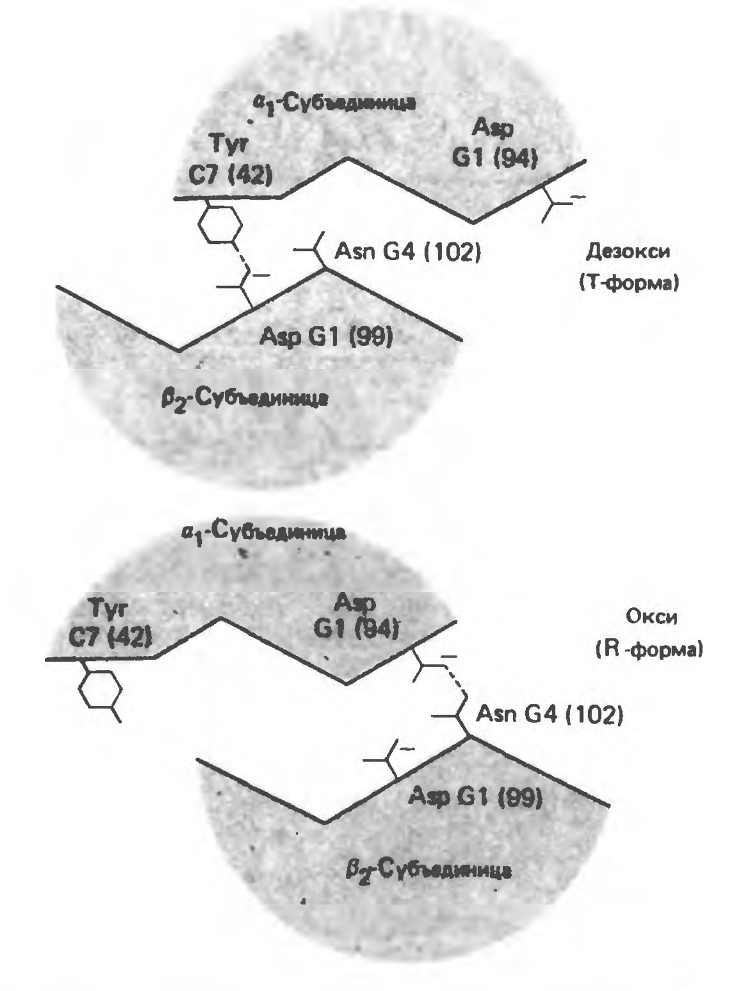


Рис. 6.11. Изменения, происходящие в области α_1/β_2-контакта при оксигенировании. Контакт как бы «перескакивает» с одного зубца на другой, с заменой одной водородной связи на другую. Остальные связи образованы неполярными остатками. (Из работы Perutz M. F.: Molecular pathology of human hemoglobin. Stereochemical interpretation of abnormal oxygen affinities. *Nature* 1971:**232**:408, с любезного разрешения.)

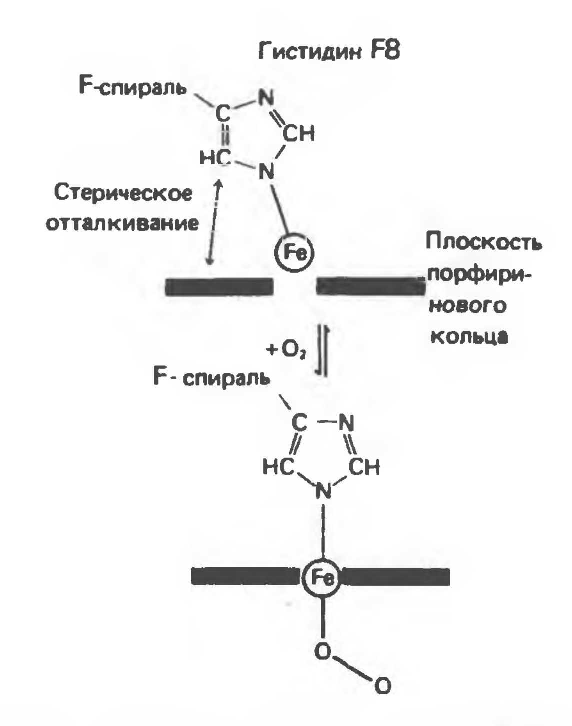


Рис. 6.13. При оксигенировании диаметр координационной сферы атома железа становится меньше, и он втягивается в плоскость гема. Вместе с атомом железа смещается гистидин F8. (Из книги Stryer L: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, 1981, с некоторыми изменениями.)

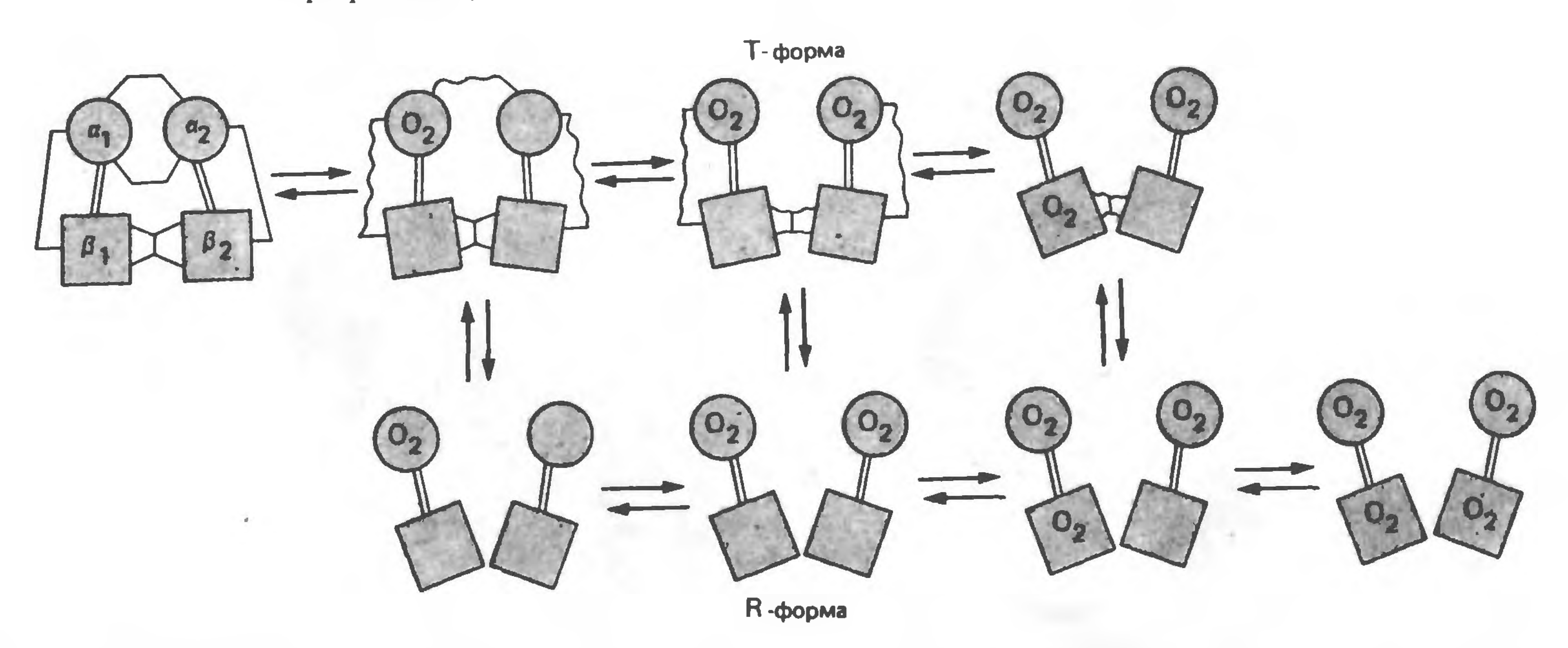


Рис. 6.12. Вероятность перехода из Т-формы в R-форму повышается по мере последовательного оксигенирования каждой из четырех гемогрупп. В представленной здесь модели солевые мостики (прямые линии), связывающие субъединицы в Т-форме, разрушаются по мере присоединения кислорода, и даже те солевые мостики, которые остаются неразрушенными, постепенно ослабляются (волнистые линии). Переход из Т- в R-состояние не связан однозначно с присоединением определенного числа молекул кислорода, однако при связывании каждой новой молекулы кислорода вероятность этого перехода повышается. На переход между двумя состояниями оказывают влияние протоны, двуокись углерода, хлорид и ДФГ. Чем выше их концентрация, тем большее число молекул кислорода должно связаться, чтобы оказался возможным переход. Полностью оксигенированные молекулы в Т-состоянии и полностью дезоксигенированные в R-состоянии не показаны — они слишком неустойчивы, чтобы присутствовать в заметном количестве. (Из работы Perutz M. F.: Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* [Dec.] 1978:**239**:92, с изменениями.)

$$CO_2 + H_2O \underset{\text{Карбоангидраза}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{Угольная кислота}}{H_2CO_3} \rightleftharpoons$$

$$\underset{\text{Самопроизвольно}}{\rightleftharpoons} HCO_3^- + H^+$$

Рис. 6.14. Образование угольной кислоты в ходе реакции, катализируемой карбоангидразой эритроцитов, и ее диссоциация на бикарбонат-ион и протон.

предотвращения опасного повышения кислотности крови должна существовать буферная система, способная поглощать избыток протонов. **Гемоглобин связывает два протона на каждые четыре освободившиеся молекулы кислорода** и определяет буферную емкость крови (рис. 6.15). В легких идет обратный процесс: **присоединение кислорода к дезоксигемоглобину сопровождается высвобождением протонов**, которые связываются с бикарбонат-ионами, переводя их в угольную кислоту. Далее эффективно действующая карбоангидраза катализирует превращение угольной кислоты в углекислый газ, выдыхаемый из легких. Таким образом, **связывание кислорода тесно сопряжено с выдыханием CO_2**. Это обратимое явление известно как **эффект Бора**. Эффект Бора является свойством тетрамерного гемоглобина и определяется гем-гемовым взаимодействием, лежащим в основе кооперативных эффектов. У миоглобина эффект Бора не обнаруживается.

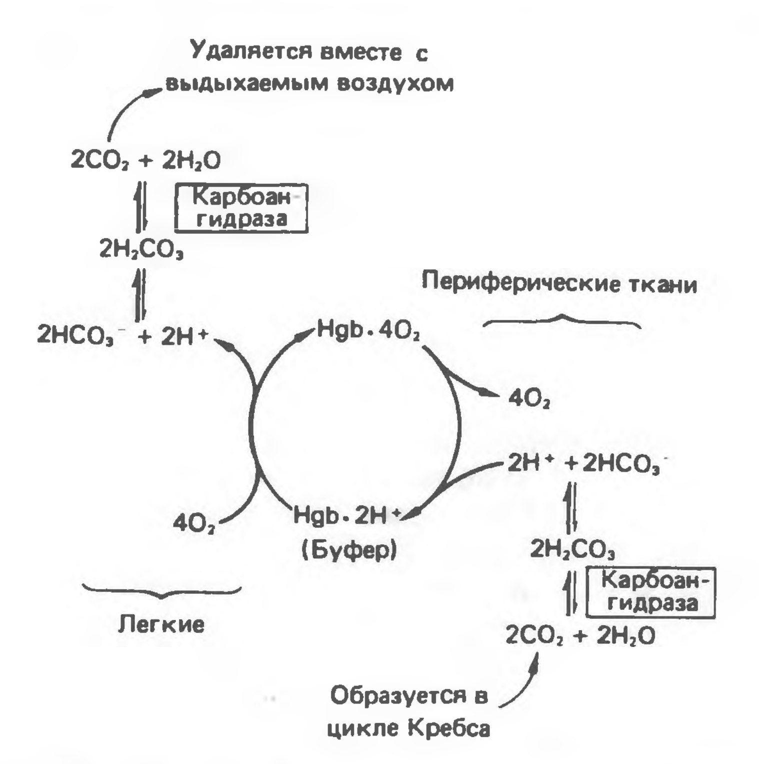


Рис. 6.15. Эффект Бора. Двуокись углерода, образовавшаяся в периферических тканях, реагирует с водой, образуя угольную кислоту, которая диссоциирует на бикарбонат-ион и протон. Дезоксигенированный гемоглобин выполняет роль буфера—он связывает протоны и поставляет их в легкие. В легких связывание гемоглобином кислорода сопровождается высвобождением протонов из гемоглобина. Протоны соединяются с бикарбонат-ионом, образуя угольную кислоту, которая при участии карбоангидразы превращается в двуокись углерода и воду. Двуокись углерода (углекислый газ) удаляется из легких с выдыхаемым воздухом.

Молекулярная основа эффекта Бора

Протоны, ответственные за эффект Бора, высвобождаются в результате разрушения солевых мостиков, которым сопровождается связывание кислорода с Т-структурой; они отсоединяются от атомов азота остатков гистидина (146) в β-цепях. Эти протоны сдвигают равновесие в сторону образования угольной кислоты, которая расщепляется карбоангидразой с образованием CO_2 (рис. 6.15).

Наоборот, при высвобождении кислорода вновь формируется Т-структура с присущими ей солевыми мостиками, при образовании которых происходит присоединение протонов к остаткам гистидина в β-цепях. Таким образом, в периферических тканях протоны благоприятствуют образованию солевых мостиков путем протонирования (по атому азота) концевых остатков гистидина в β-субъединицах. Образование солевых мостиков форсирует освобождение кислорода из оксигенированной R-формы гемоглобина. Итак, **повышение концентрации протонов способствует освобождению кислорода, а повышение концентрации кислорода стимулирует высвобождение протонов.** Первый из этих эффектов проявляется в сдвиге кривой диссоциации кислорода вправо при повышении концентрации ионов водорода (протонов).

Регуляция 2,3-бисфосфоглицератом

Недостаток кислорода в периферических тканях приводит к накоплению 2,3-бисфосфоглицерата (дифосфоглицерата, ДФГ) (рис. 6.16). Это соединение образуется из 1,3-бисфосфоглицерата, промежуточного продукта гликолиза. Тетрамер гемоглобина связывает одну молекулу ДФГ, которая размещается в центральной полости, выстланной остатками всех четырех субъединиц. Объем этой полости достаточен для размещения ДФГ только в том случае, когда молекула гемоглобина находится в **Т-форме** и образуется достаточно широкий просвет между Н-

Рис. 6.16. Структура 2,3-бисфосфоглицерата.

спиралями β-цепей. Связывание ДФГ осуществляется путем образования солевых мостиков между атомами кислорода ДФГ и группами, принадлежащими обеим β-цепям: концевыми аминогруппами остатков ValNA1, аминогруппами остатков LysEF6 и боковыми группами остатков His H21 (рис. 6.17). Таким образом, **ДФГ стабилизирует дезоксигенированную Т-форму гемоглобина, образуя поперечные связи между β-цепями**—дополнительные солевые мостики, которые должны быть разрушены при переходе гемоглобина из Т- в R-форму.

С фетальным гемоглобином ДФГ связывается менее прочно, чем с гемоглобином взрослого человека, поскольку в его β-цепи в положении **H21** находится не His, а Ser, который не может участвовать в формировании солевых мостиков, удерживающих ДФГ в центральной полости. Поэтому **ДФГ в меньшей степени способствуют стабилизации Т-формы фетального гемоглобина** и последний обладает **более высоким сродством** к кислороду по сравнению с гемоглобином взрослого человека.

Пусковым механизмом перехода между R- и Т-формами гемоглобина служит **перемещение атома железа в плоскость порфиринового кольца или от нее.** Источником свободной энергии для этих процессов (около 3000 кал/моль) служат стерические и электростатические факторы. Таким образом, совсем небольшое смещение атома Fe^{2+} относительно порфиринового кольца вызывает значительные изменения конформации гемоглобина и решающим образом воздействует на его ответную реакцию на сигнал, поступающий из внешней среды.

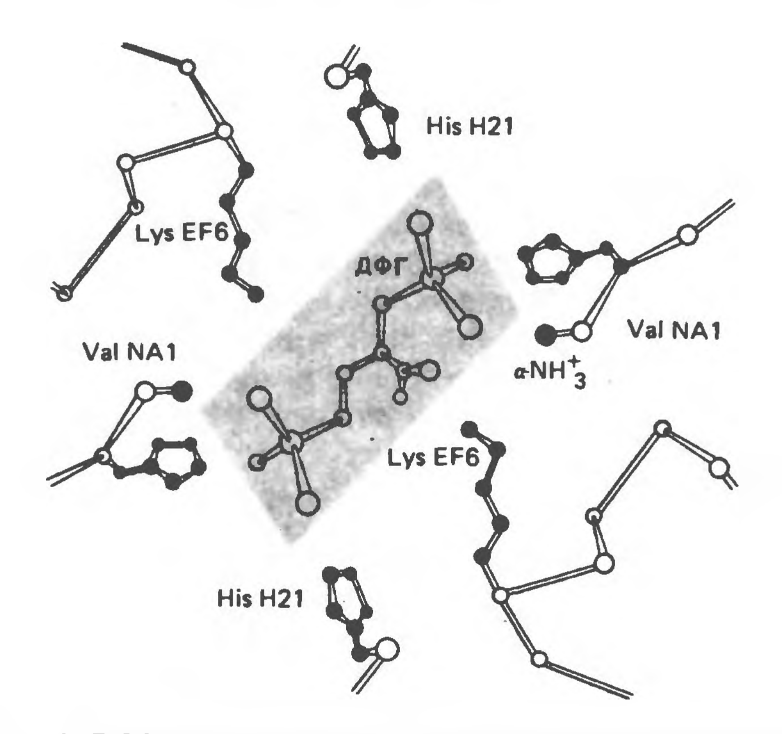


Рис. 6.17. Механизм связывания ДФГ с дезоксигемоглобином человека. ДФГ взаимодействует с тремя положительно заряженными группами в каждой из β-цепей. (Из работы Arnone A.: X-ray diffraction study of bonding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. *Nature* 1972:**237**:146, с разрешения.)

Мутантные гемоглобины человека

Мутации генов, кодирующих α- и β-цепи, могут существенным образом сказываться на их биологической функции. Известно несколько сот мутантных гемоглобинов человека (в большинстве случаев функционально активных), и о некоторых из них, отличающихся сильным изменением биологических функций, речь пойдет ниже. Патологическое состояние, при котором мутация вызывает изменение биологической функции гемоглобина, называют **гемоглобинопатией.**

В семействе гемоглобинов М остатки проксимального или дистального гистидина в α- или β-субъединицах заменены на остатки тирозина. Атом железа в составе гема находится в этом случае в Fe^{3+}-состоянии, что обусловлено образованием прочного ионного комплекса с фенолятным анионом тирозина. Результатом такой аномалии является метгемоглобинемия, поскольку ферри-гем не способен связывать O_2. В α-цепи гемоглобина М R—Т-равновесие сдвинуто в сторону образования Т-формы. Сродство к кислороду низкое, эффект Бора отсутствует. В β-цепях гемоглобинов М может происходить переход между R- и Т-состояниями и, следовательно, наблюдается эффект Бора.

Мутации, приводящие к преимущественному образованию R-формы (в качестве примера можно привести гемоглобин Чезапик), отличаются тем, что соответствующие гемоглобины обладают **повышенным сродством к кислороду.** Подобные гемоглобины не способны поставлять достаточное количество кислорода периферическим тканям. Возникает тканевая гипоксия, ведущая к развитию **полицитемии** (повышению концентрации эритроцитов).

Гемоглобин при серповидноклеточной анемии

В гемоглобине S остаток Glu $A_2(6)\beta$ замещен на Val. Остаток A_2 (Glu или Val) располагается на поверхности молекулы гемоглобина и контактирует с водой, и замещение полярного остатка Glu на неполярный Val приводит к появлению на поверхности β-субъединицы «липкого участка». Этот липкий участок присутствует как в оксигенированном, так и в дезоксигенированном гемоглобине S (в гемоглобине А он отсутствует). На поверхности **дезоксигенированного гемоглобина** существует **комплементарный участок,** способный прочно связываться с липким участком β-субъединицы, тогда как в оксигенированном гемоглобине этот участок маскируется другими группами (рис. 6.18). Когда гемоглобин S переходит в дезоксигенированное состояние, его липкий участок связывается с комплементарным участком на другой молекуле дезоксигенированного гемоглобина. **Происходит полимеризация дезоксигемоглобина S и его осаждение в виде длинных волокон.** Волокна

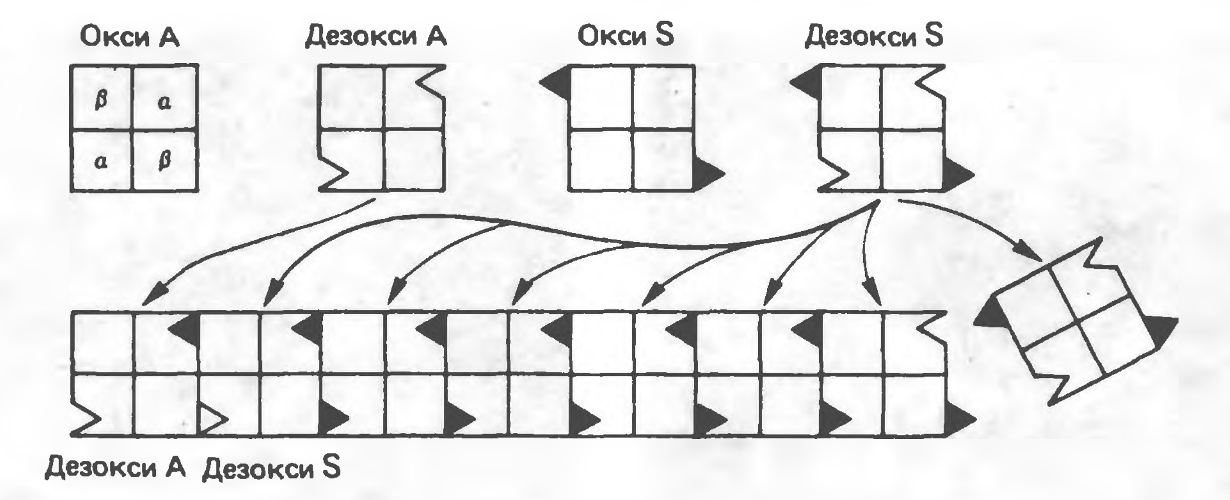


Рис. 6.18. Схема, поясняющая взаимодействие липкого участка гемоглобина S (черный треугольник) с рецептором липкого участка (светлый треугольник) дезоксигемоглобина А и дезоксигемоглобина S. Наличие комплементарных участков на поверхности молекулы дезоксигемоглобина S способствует его полимеризации с образованием волокнистых структур. В присутствии дезоксигемоглобина А процесс полимеризации останавливается, поскольку на поверхности этой молекулы липкого участка нет. (Из книги Stryer L.: Biochemistry, 2nd ed., Freeman, 1981, с некоторыми изменениями.)

дезоксигемоглобина S механически деформируют эритроцит, придавая ему серповидную форму, что приводит к лизису клеток и множеству вторичных клинических проявлений. Таким образом, если бы можно было поддерживать гемоглобин S в оксигенированном состоянии или по крайней мере свести к минимуму концентрацию дезоксигенированного гемоглобина S, то нам удалось бы предотвратить полимеризацию дезоксигенированного гемоглобина S и образование «серповидных» клеток. Ясно, что **полимеризации подвержена Т-форма гемоглобина S.** Интересно отметить (хотя в практическом плане это мало существенно), что ферри-ион метгемоглобина А остается в плоскости порфиринового кольца и тем самым стабилизирует R-форму гемоглобина. То же относится и к гемоглобину при серповидноклеточной анемии: гемоглобин S в ферри-состоянии (метгемоглобин S) не подвержен полимеризации, поскольку он стабилизирован в R-форме.

В дезоксигемоглобине А тоже имеется рецепторный участок, способный взаимодействовать с липким участком оксигенированного или дезоксигенированного гемоглобина S (рис. 6.18), но присоединения «липкого» гемоглобина S к дезоксигемоглобину А недостаточно для образования полимера, поскольку сам дезоксигемоглобин А липкого участка не содержит и не может связать следующую молекулу гемоглобина. Следовательно, **связывание дезоксигемоглобина А с R- или Т-формой гемоглобина S прерывает полимеризацию.**

В результате полимеризации дезоксигемоглобина S образуются спиральные фибриллярные структуры. При этом каждая молекула гемоглобина контактирует с четырьмя соседними молекулами (рис. 6.19). Образование подобных трубчатых волокон ответственно за механические нарушения в содержащем

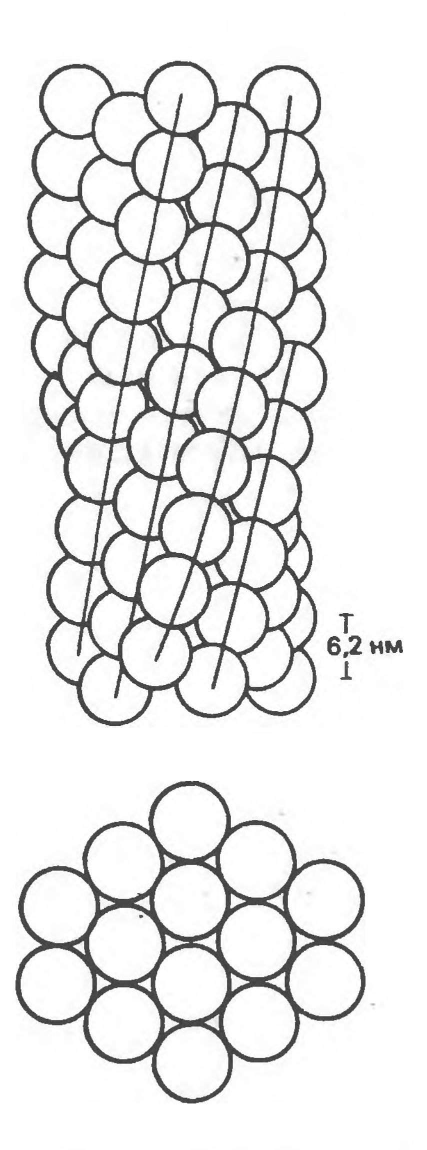


Рис. 6.19. Предполагаемая спиральная структура волокна из агрегированных молекул дезоксигемоглобина S. (Из работы Maugh T. II: A new understanding of sickle cell emerges. *Science* 1981:**211**:265, с разрешения.)





Рис. 6.20. Электронные микрофотографии нормального (*А*) и серповидного (*Б*) эритроцитов. Изменения в молекуле β-глобина, приводящие к такому изменению формы клетки, вызваны мутацией единственного основания в ДНК (А вместо Т), в результате чего в цепи β-глобина происходит замена глутамата на валин (гл. 36).

их эритроците: он приобретает серповидную форму (рис. 6.20), становится подверженным лизису в момент прохождения им щелей в синусоидах селезенки.

Талассемии

Другая важная группа нарушений, связанных с аномалиями гемоглобина — талассемии. Для них характерна пониженная скорость синтеза α-цепей гемоглобина (α-талассемия) или β-цепей (β-талассемия). Это приводит к анемии, которая может принимать очень тяжелую форму. В последние годы достигнут ощутимый прогресс в выяснении молекулярных механизмов, ответственных за развитие талассемии (см. гл. 36).

ЛИТЕРАТУРА

Dean J., Schechter A. N. Sickle-cell anemia: Molecular and cellular basis of therapeutic approaches. (3 parts), N. Engl. J. Med., 1978, **299**, 752, 804, 863.

Klotz I. M., Haney D. N., King L. C. Rational approaches to chemotherapy: Antisickling agents, Science, 1981, **213**, 724.

Perutz M. F. Hemoglogin structure and respiratory transport, Sci. Am. (Dec.), 1978, **239**, 92.

Perutz M. F. The regulation of oxygen-affinity of hemoglobin: Influence of structure of globin on heme iron, Annu. Rev. Biochem., 1979, **48**, 327.

Stamatoyannopoulos G. The molecular basis of hemoglobin disease, Annu. Rev. Genet., 1972, **6**, 47.

Winslow R. M., Anderson W. F. The hemoglobinopathies, Page 1666. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., Stanbury J. B. et al. (eds.), McGraw-Hill, 1983.

Глава 7

Ферменты: общие свойства

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Катализаторы — это вещества, ускоряющие химические реакции; в ходе реакции они претерпевают физические изменения, но по ее завершении возвращаются в исходное состояние. **Ферменты** являются **белковыми катализаторами** биохимических реакций, большая часть которых в отсутствие ферментов протекала бы крайне медленно. В отличие от небелковых катализаторов (H^+, OH^-, ионы металлов) каждый фермент способен катализировать лишь очень небольшое число реакций, часто только одну. Таким образом, ферменты представляют собой **реакционно-специфические** катализаторы. **Практически все биохимические реакции катализируются ферментами**.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Ферменты совершенно необходимы для существования жизни на Земле. Поэтому неудивительно, что мы встречаемся с ними во многих областях биомедицинских наук. Многие болезни (врожденные нарушения метаболизма) определяются генетически обусловленными нарушениями в синтезе ферментов. При повреждении клеток (вызванном, например, недостатком кровоснабжения или воспалением) некоторые ферменты попадают в плазму крови. Измерение активности таких ферментов обычно используется для диагностики многих распространенных заболеваний (например, инфаркта миокарда). Диагностическая энзимология является областью медицины, использующей ферменты для диагностики и контроля за результатами лечения. Ферменты применяются и в терапии.

КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ И НОМЕНКЛАТУРА

Первоначально ферментам давали названия, образуемые путем добавления окончания **-аза** к названию субстрата, на который данный фермент действует. Так, ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), были названы амилазами; ферменты, гидролизующие жиры (липос), — липазами; ферменты, гидролизующие белки (протеины),— протеиназами. Позднее ферментам, катализирующим сходные по типу реакции, стали давать название, указывающее тип соответствующей реакции — дегидрогеназы, оксидазы, декарбоксилазы, ацилазы и т. д. Многие из этих названий используются и теперь.

Номенклатура, введенная **Международным биохимическим союзом (IUB)**, на первый взгляд кажется сложной и громоздкой, но зато она является однозначной. Главный ее принцип состоит в том, что ферменты называют и классифицируют в соответствии с типом катализируемой химической реакции и ее механизмом; это существенно облегчает систематизацию данных, относящихся к различным аспектам метаболизма. Основные черты системы, введенной IUB, состоят в следующем.

1. **Реакции и ферменты, которые их катализируют, подразделяются на шесть классов**, в каждом из которых имеется несколько подклассов (от четырех до 13).

2. **Название фермента состоит из двух частей**: первая часть — название субстрата (или субстратов); вторая указывает **тип катализируемой реакции** и оканчивается на **-аза**.

3. **Дополнительная информация**, если она необходима для уточнения, заключается в скобки. Например, фермент, катализирующий реакцию L-малат + NAD^+ = Пируват + CO_2 + NADH + H^+, имеет номер 1.1.1.37 и называется L-малат: NAD^+ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая).

4. **Каждый фермент имеет кодовый номер по классификации ферментов (КФ)**: первая цифра характеризует класс реакции, вторая — подкласс и третья — подподкласс. Четвертая цифра указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Таким образом, КФ 2.7.1.1 означает, что фермент относится к классу 2 (трансфераза), подклассу 7 (перенос фосфата) и подподклассу 1 (акцептором фосфата является спирт). Последняя цифра обозначает фермент гексокиназу, или ATP: D-гексозо-6-фосфотрансферазу, т.е. фермент, катализирующий

перенос фосфата с ATP на гидроксильную группу атома углерода в шестом положении глюкозы.

Ниже представлены все шесть классов ферментов и некоторые конкретные примеры. В скобках указано рекомендуемое название.

---

1. Оксидоредуктазы. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов, S и S′:

$$S_{восст} + S'_{окисл} = S_{окисл} + S'_{восст}.$$

Катализируют реакции, в которых участвуют такие группы, как CH—OH, CH—CH, C = O, CH—NH_2 и —CH—NH—. Некоторые подклассы:

1.1. Ферменты, действующие на группу CH—OH (донор электронов). *Например:*

1.1.1.1. Алкоголь: NAD^+ оксидоредуктаза [алкогольдегидрогеназа]

Спирт + NAD^+ = Альдегид или кетон + NADH + H^+.

1.4. Ферменты, действующие на группу CH—NH_2 (донор электронов). *Например:*

1.4.1.3. L-Глутамат: $NAD(P)^+$ оксидоредуктаза (дезаминирующая) [глутаматдегидрогеназа из печени животных]. Запись $NAD(P)^+$ означает, что акцептором электронов может служить либо NAD^+, либо $NADP^+$.

L-Глутамат + H_2O + $NAD(P)^+$ = = α-Кетоглутарат + NH_4^+ + NAD(P)H + H^+.

2. Трансферазы. Ферменты, катализирующие перенос группы G (отличной от атома водорода) с субстрата S на субстрат S′:

$$S—G + S' = S'—G + S.$$

Катализируют перенос одноуглеродных групп, альдегидных или кетонных остатков, а также ацильных, алкильных, гликозильных групп и групп, содержащих фосфор и серу. Некоторые подклассы:

2.3. Ацилтрансферазы. *Например:*

2.3.1.6. Ацетил-CoA:холин O-ацетилтрансфераза [холин-ацетилтрансфераза]

Ацетил-CoA + Холин = CoA + O-Ацетилхолин.

2.7. Ферменты, катализирующие перенос группы, содержащей фосфор. *Например:*

2.7.1.1. ATP: D-гексоза 6-фосфотрансфераза [гексокиназа]

ATP + D-Гексоза = ADP + D-Гексозо-6-фосфат.

3. Гидролазы. Ферменты, катализирующие гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозильных связей, кислотных ангидридов, связей C—C, C-галоида и P—N. *Например:*

3.1. Ферменты, действующие на сложноэфирные связи. *Например:*

3.1.1.8. Ацилхолин — ацилгидролаза [псевдохолинэстераза]

Ацилхолин + H_2O = Холин + Кислота.

3.2. Ферменты, действующие на гликозильные соединения. *Например:*

3.2.1.23. β-D-Галактозид — галактогидролаза [β-галактозидаза]

β-D-Галактозид + H_2O = Спирт + D-Галактоза.

3.4. Ферменты, действующие на пептидные связи. Классификация (с подразделением на 11 подклассов) учитывает различия между пептидазами и протеазами, выделяет ферменты, гидролизующие дипептиды или более крупные пептиды, отщепляющие одну или большее число аминокислот, атакующие связь на C- или N-конце. Протеиназы в соответствии с механизмом катализа подразделяются на сериновые, тиоловые и металлозависимые. *Например:*

3.4.21. Сериновые протеиназы. *Например:* химотрипсин, трипсин, плазмин, факторы свертывания крови IXa и XIa.

3.4.23. Карбоксильные (кислые) протеиназы. *Например:* пепсины A, B и C.

4. Лиазы. Ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому механизму, с образованием двойных связей.

```
X   Y
|   |
C—C = X—Y + C = C
```

Ферменты, действующие на связи C—C, C—O, C—N, C—S и C — галоид. Некоторые подгруппы:

4.1.2. Альдегид-лиазы. *Например:*

4.1.2.7. Кетозо-1-фосфат-альдолаза [альдолаза]

Кетозо-1-фосфат = Дигидроксиацетонфосфат + Альдегид.

4.2. Углерод — кислород лиазы. *Например:*

4.2.1.2. L-малат — гидро-лиаза [фумараза]

L-малат = Фумарат + H_2O.

5. Изомеразы. В этот класс включены все ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических, геометрических и позиционных изомеров. Некоторые подклассы:

5.2. *Цис-транс*-изомеразы. *Например:*

5.2.1.3. *все-транс*-Ретиналь 11-*цис-транс*-изомераза [ретинальизомераза]

все-транс-Ретиналь = 11-*цис*-Ретиналь.

5.3. Ферменты, катализирующие взаимопревращение альдоз и кетоз. *Например:*

5.3.1.1. D-Глицеральдегид-3-фосфаткетол-изомераза [триозофосфатизомераза]

D-Глицеральдегид-3-фосфат = Дигидроксиацетонфосфат.

6. Лигазы. (от лат. *лигаре* — связывать). Ферменты, катализирующие соединение двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТР или подобного соединения. В этот класс включены ферменты, катализирующие реакции, в ходе которых образуются связи С—О, С—S, С—N и С—С. Некоторые подклассы:

6.3. Ферменты, катализирующие образование связей С—N. *Например:*

6.3.1.2. L-Глутамат:аммиак лигаза (ADP) [глутаминсинтетаза]

$$\text{ATP} + \text{L-Глутамат} + \text{NH}_4^+ = \text{ADP} + \text{Ортофосфат} + \text{L-Глутамин}.$$

6.4. Ферменты, катализирующие образование связей С—С. *Например:*

6.4.1.2. Ацетил-СоА:CO_2 лигаза (ADP) [ацетил-СоА — карбоксилаза]

$$\text{ATP} + \text{Ацетил-CoA} + \text{CO}_2 = \text{ADP} + \text{P}_i + \text{Малонил-CoA}.$$

КОФЕРМЕНТЫ

Многие ферменты оказывают каталитическое действие на субстраты только в присутствии специфического термостабильного низкомолекулярного органического соединения — **кофермента**. В таких случаях **холофермент** (каталитически активный комплекс) состоит из **апофермента** (белковая часть) и связанного с ним **кофермента**. Кофермент может быть связан с апоферментом ковалентными или нековалентными связями. Термин «простетическая группа» относится к ковалентно связанному коферменту. К числу реакций, требующих присутствия коферментов, относятся окислительно-восстановительные реакции, реакции переноса групп и изомеризации, а также реакции конденсации (по системе IUB это классы 1, 2, 5 и 6). Реакции расщепления, например гидролитические реакции, катализируемые пищеварительными ферментами, протекают в отсутствие кофермента (по системе IUB это классы 3 и 4).

Коферменты как вторые субстраты

Кофермент можно рассматривать как второй субстрат, или **косубстрат**, по двум причинам. Во-первых, в ходе реакции **кофермент претерпевает химические изменения, в точности противоположные изменениям, которые происходят в субстрате**. Например, в окислительно-восстановительных дегидрогеназных реакциях молекула субстрата окисляется, а молекула кофермента восстанавливается (рис. 7.1).

Подобным же образом в реакциях переаминирования пиридоксальфосфат выступает как второй субстрат в двух сочетанных реакциях и как переносчик аминогруппы между различными α-амино- и α-кетокислотами.

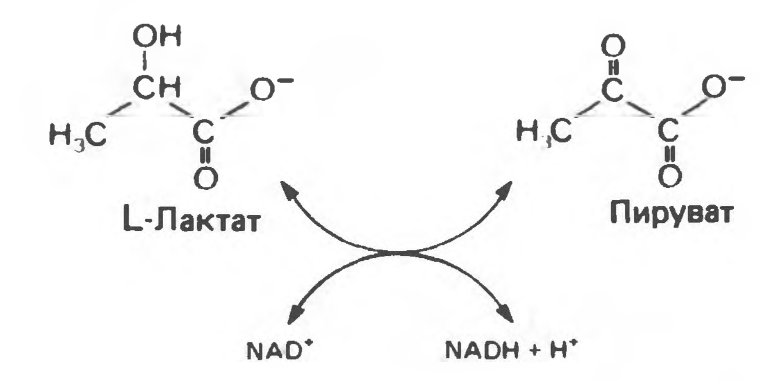


Рис. 7.1. Пример окислительно-восстановительной реакции, в которой NAD^+ выступает в роли косубстрата.

Вторая причина, по которой кофермент можно считать равноправным участником реакции, заключается в том, что именно его участие может иметь фундаментальное физиологическое значение. Например, работа мышцы в анаэробных условиях сопровождается превращением пирувата в лактат. Но в этом случае важны совсем не лактат и не пируват: предназначением реакции является превращение NADH в NAD^+. В отсутствие NAD^+ гликолиз продолжаться не может и анаэробный синтез АТР (а следовательно, и работа мышцы) прекращается. Восстановление пирувата до лактата в анаэробных условиях обеспечивает окисление NADH в NAD^+, необходимый для синтеза АТР. Функцию образования NAD^+ могут выполнять и другие реакции. Значение этого процесса становится очевидным, если перейти от животных к другим формам жизни. У бактерий и дрожжей, растущих в анаэробных условиях, вещества, образующиеся из пирувата, служат окислителями для NADH, при этом сами они восстанавливаются (табл. 7.1).

Таблица 7.1. Системы анаэробной регенерации NAD^+

Окислитель	Восстановленный продукт	Организмы, ткани
Пируват	Лактат	Мышцы, гомоферментативные молочнокислые бактерии
Ацетальдегид	Этанол	Дрожжи
Дигидроксиацетонфосфат	α-Глицерофосфат	*E. coli*
Фруктоза	Маннитол	Гетероферментативные молочнокисые бактерии

Роль коферментов как переносчиков групп на промежуточных стадиях метаболизма

Биохимические реакции переноса можно представить в виде

$$D—G + A \rightleftarrows A—G + D.$$

Здесь функциональная группа G переносится от молекулы донора, D—G, на молекулу акцептора A. Кофермент в этом случае может выступать либо как конечный акцептор (в реакциях отщепления водорода), либо как промежуточный переносчик (в реакциях переаминирования). Эту вторую функцию можно проиллюстрировать следующим образом:

D–G ⟶ D; CoE ⟶ CoE–G; CoE–G ⟶ CoE; A ⟶ A–G

На этой схеме показан только один комплекс (CoE—G), но может участвовать и несколько таких промежуточных комплексов.

Если переносимой группой является атом водорода, то обычно указывают лишь левую полуреакцию:

D–H ⟶ D; CoE ⟶ CoE–H

Реакции переноса водорода, протекающие в живых клетках (табл. 7.1), идут по схеме

D–H ⟶ D; CoE ⟶ CoE–H; CoE–H ⟶ CoE; A ⟶ A–H

Можно предложить следующую классификацию коферментов:

Коферменты, участвующие в переносе любых групп, кроме атомов водорода:

Сахарофосфаты
CoA·SH
Тиаминпирофосфат
Пиридоксальфосфат
Фолиатные коферменты
Биотин
Кобамидные (B_{12}) коферменты
Липоевая кислота

Коферменты, участвующие в переносе атомов водорода:

NAD^+, $NADP^+$
FMN, FAD
Липоевая кислота
Кофермент Q

Коферменты — производные витаминов группы B и AMP

Витамины группы B входят как составная часть во многие коферменты. Например, ферменты, участвующие в метаболизме аминокислот, нуждаются в коферментах — производных витамина B_6. Витамины группы B — **никотинамид, тиамин, рибофлавин** и **пантотеновая кислота** — являются компонентами коферментов, участвующих в процессах биологического окисления и восстановления, а коферментные формы **фолиевой кислоты** и **кобамида** участвуют в переносе одноуглеродных фрагментов.

Структурным компонентом многих коферментов является адениновое кольцо, соединенное с D-рибозой и неорганическим фосфатом. Эти коферменты можно рассматривать, следовательно, как производные аденозинмонофосфата (AMP) (см. табл. 34.1). Структурные формулы NAD^+ и $NADP^+$ приведены на рис. 7.2.

«ТРЕХТОЧЕЧНАЯ ФИКСАЦИЯ» СУБСТРАТОВ НА ФЕРМЕНТАХ

Большинство субстратов образует по меньшей мере три связи с ферментом. Благодаря такой **«трехточечной фиксации»** симметричная молекула может проявлять асимметрию. Чтобы это пояснить, представим область фермента, связывающую субстрат, как участок плоской поверхности (хотя, как мы вскоре увидим, субстратсвязывающая «площадка» фермента редко бывает плоской, а возможно, и не бывает совсем). На рис. 7.3 молекула субстрата представлена в виде атома углерода с заместителями, три из которых взаимодействуют с тремя точками на плоском участке поверхности фермента. Если молекула субстрата может подойти к этому участку только с одной стороны и взаимодействовать могут

Рис. 7.2. $NAD(P)^+$; R = H (в случае NAD^+) или $^-OPO_3^{2-}$ (в случае $NADP^+$).

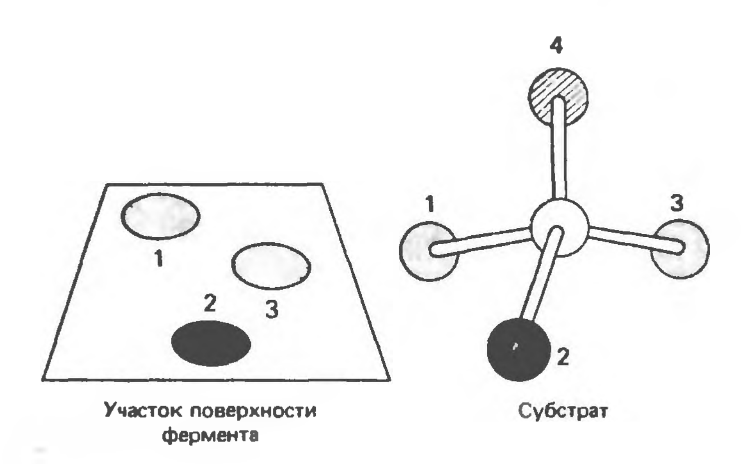


Рис. 7.3. «Трехточечная фиксация» субстрата на плоском активном центре фермента.

только комплементарные структуры субстрата и фермента (в реальных ферментах оба этих условия соблюдаются), то молекула субстрата может связываться с ферментом единственным способом, даже если группы 1 и 3 идентичны. Перебирая мысленно все возможные пространственные ориентации молекулы субстрата, мы можем убедиться, что с тремя точками плоской поверхности (с одной и той же стороны) молекула может связаться только в одной ориентации. Отсюда следует, что группы 1 и 3, хотя они и идентичны, при связывании с ферментом становятся неэквивалентными из-за различия в их окружении. Химические изменения будут происходить только с группой 1, но не с группой 3 (или наоборот). Обобщая эти рассуждения, мы можем объяснить теперь, почему ферментативное восстановление оптически неактивного пирувата приводит к образованию именно L-, а не D, L-лактата.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Способность фермента катализировать одну и только одну специфическую реакцию является, пожалуй, наиболее важным его свойством. Благодаря этому скорости специфических метаболических процессов могут регулироваться путем изменения каталитической активности специфических ферментов. Правда, многие ферменты катализируют реакции одного типа (перенос фосфата, окислительно-восстановительные реакции и т. д.), субстратами при этом является небольшое число структурно сходных соединений. Реакции с альтернативными субстратами происходят в тех случаях, когда эти субстраты присутствуют в высоких концентрациях. Протекают ли в живых организмах все реакции, возможные при участии данного фермента, зависит от относительной концентрации альтернативных субстратов в клетке и относительного сродства фермента к этим субстратам. Ниже мы рассмотрим некоторые общие аспекты специфичности ферментов.

Оптическая специфичность ферментов

За исключением эпимераз (рацемаз), которые катализируют взаимопревращение оптических изомеров, **ферменты в общем случае проявляют асболютную оптическую специфичность, по крайней мере по отношению к одному из участков молекулы субстрата.** Так, ферменты гликолитического и прямого окислительного пути катализируют превращения только D-, но не L-фосфосахаров. За единичными исключениями (например, почечная оксидаза D-аминокислот) большинство ферментов млекопитающих катализирует превращение только L-изомеров аминокислот.

Оптическая специфичность может относиться как к фрагменту молекулы, так и к молекуле в целом. Иллюстрацией служит специфичность гликозидаз. Эти ферменты катализируют гидролиз гликозидных связей между сахаром и спиртовой группой: они высокоспецифичны как к сахарному фрагменту, так и к характеру гликозидной связи (α или β), но относительно неспецифичны к спиртовому фрагменту молекулы.

Групповая специфичность ферментов

Литические ферменты действуют на специфические химические группировки: гликозидазы — на гликозидные связи, пепсин и трипсин — на пептидные связи, эстеразы — на сложноэфирные связи. Действие этих ферментов распространяется на большое число субстратов, что позволяет организму обойтись небольшим числом пищеварительных ферментов — иначе их потребовалось бы намного больше. Многие протеазы способны также катализировать гидролиз сложных эфиров. Хотя способность протеаз гидролизовать сложноэфирные связи не имеет физиологического значения, использование сложноэфирных синтетических субстратов для изучения механизма их действия оказалось весьма ценным.

Отдельные литические ферменты отличаются более высокой групповой специфичностью. Так, химотрипсин гидролизует преимущественно пептидные связи, в которых карбоксильная группа принадлежит ароматическим аминокислотам — фенилаланину, тирозину или триптофану. Карбоксипептидазы и аминопептидазы отщепляют аминокислоты по одной с карбоксильного или с амино-конца соответственно.

Некоторые оксидоредуктазы способны использовать в качестве акцепторов электронов и NAD^+, и $NADP^+$, но бóльшая их часть использует только один из них. Обобщая, можно сказать, **что оксидоредуктазы млекопитающих, которые участвуют в биосинтетических процессах (например, в синтезе жирных кислот или стероидов), обычно используют в качестве восстановителя NADPH,** тогда как **ферменты,** уча-

ствующие в процессах расщепления (гликолиз, окисление жирных кислот), в качестве окислителя используют преимущественно NAD^+.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Ферменты в отличие от органических или неорганических веществ присутствуют в клетках в чрезвычайно малых количествах, и определение их содержания в тканевых экстрактах или жидкостях представляет особую проблему. К счастью, **весьма чувствительные и специфичные методы оказалось возможным создать на основе определения каталитической активности ферментов.**

Чтобы оценить количество фермента в пробе тканевого экстракта или биологической жидкости, измеряют **скорость реакции**, катализируемой содержащимся в этой пробе ферментом. При определенных условиях **измеряемая скорость пропорциональна количеству присутствующего фермента**. Поскольку при этом трудно определить число молекул фермента в пробе или их общую массу, результаты выражают в условных **единицах активности фермента.** Далее сравнивают относительные количества фермента в различных экстрактах. Единицы активности удобнее всего выражать в микромолях (мкмоль, 10^{-6} моль), наномолях (нмоль, 10^{-9} моль) или пикомолях (пмоль, 10^{-12} моль) израсходованного субстрата или образовавшегося продукта за единицу времени (в минуту). Соответствующие международные единицы активности ферментов обозначаются μU, nU или pU.

Пример количественного анализа ферментативной активности; определение содержания дегидрогеназы

При измерении скоростей реакций, протекающих с участием NAD^+ или $NADP^+$ (реакции катализируются дегидрогеназами), можно воспользоваться тем обстоятельством, что NADH и NADPH (но не NAD^+ и $NADP^+$) поглощают свет с длиной волны 340 нм (рис. 7.4).

Окисление NADH в NAD^+ (или обратный процесс) сопровождается изменением оптической плотности (D) растворов при 340 нм, и при определенных условиях скорость изменения D оказывается пропорциональна активности фермента (рис. 7.5).

Для получения калибровочной кривой (рис. 7.6) строят график зависимости скорости изменения оптической плотности (наклона прямых на рис. 7.5) от объема добавленного ферментного препарата. Количество фермента, присутствующего в исследуемом растворе, можно найти по наблюдаемой скорости изменения D при 340 нм.

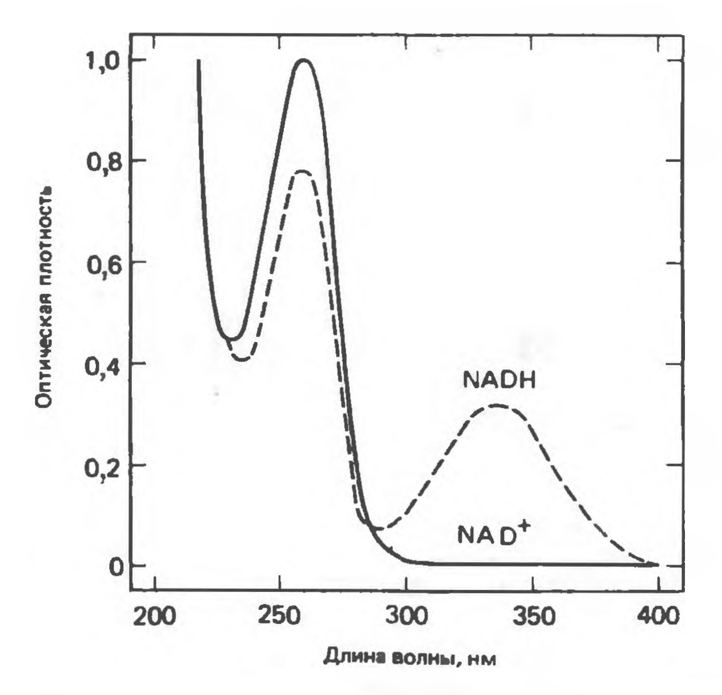


Рис. 7.4. Спектры поглощения NAD^+ и NADH. Концентрация растворов 44 мг/л, длина оптического пути 1 см. Аналогичные спектры имеют $NADP^+$ и NADPH соответственно.

Сопряженный ферментный анализ

В предыдущем примере оценка ферментативной активности основывалась на измерении скорости образования продукта (NADH). Скорость образования продукта (или, реже, скорость расходования суб-

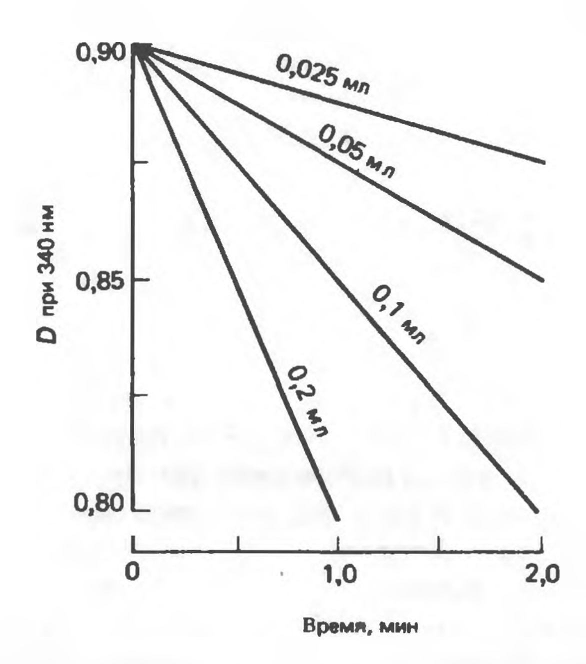


Рис. 7.5. Принцип измерения активности NADH- или NADPH-зависимой дегидрогеназы. Измеряют скорость изменения оптической плотности при 340 нм, обусловленного превращением восстановленного кофермента в окисленную форму. В кювету добавляют окисленный субстрат (S), восстановленный кофермент и буфер и регистрируют поглощение при 340 нм. Вначале наблюдается высокая оптическая плотность из-за сильного поглощения NADH (или NADPH). При добавлении 0,025—0,2 мл стандартного раствора фермента оптическая плотность понижается.

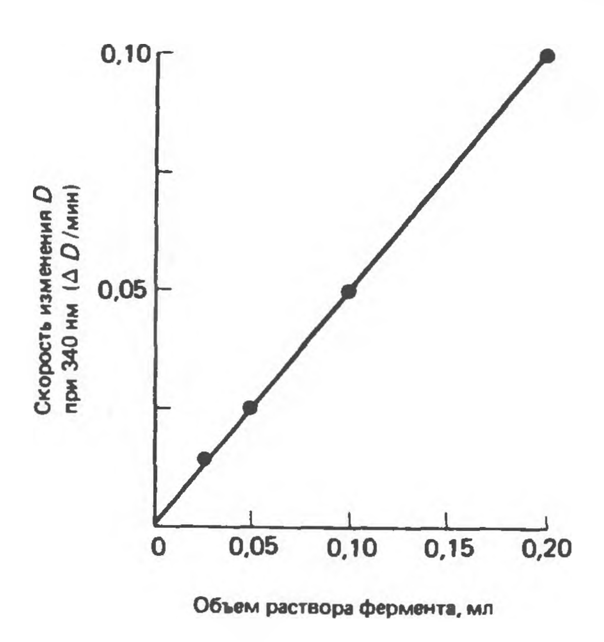


Рис. 7.6. Калибровочная кривая для определения количества фермента. По оси ординат отложен тангенс угла наклона прямых, приведенных на рис. 7.5, по оси абсцисс — количество фермента.

страта) можно использовать для определения активности не только дегидрогеназ, но и других ферментов. Конкретный метод количественной оценки диктуется физико-химическими свойствами продукта или субстрата. Во многих случаях бывает удобно подвергать образовавшийся продукт реакции действию дегидрогеназы, для которой этот продукт является субстратом (рис. 7.7).

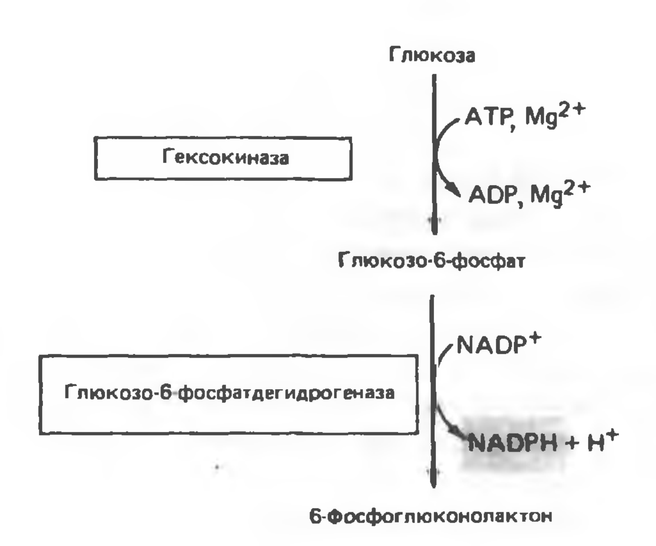


Рис. 7.7. Определение активности гексокиназы в системе, в которой протекает сопряженная ферментативная реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глюкоза, ATP, Mg^{2+} и $NADP^+$ добавлены в избытке. В этих условиях скорость общей сопряженной реакции зависит от количества добавленной гексокиназы. Эту скорость определяют по образованию NADPH, который поглощает свет при 340 нм.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Вся информация об отдельных метаболических реакциях, о промежуточных соединениях, образующихся на последовательных этапах различных метаболических путей, а также о механизме регуляции работы катализаторов получена главным образом с использованием очищенных препаратов ферментов. Высокоочищенные препараты ферментов необходимо иметь также и для того, чтобы получить надежные данные о кинетике, кофакторах, активных центрах, о структуре и механизме действия ферментов.

Процесс очистки состоит в выделении данного фермента из грубого клеточного экстракта, содержащего множество других компонентов. Небольшие молекулы удаляются диализом или гель-фильтрацией; нуклеиновые кислоты — осаждением путем добавления антибиотика стрептомицина и т. д. Основная проблема — отделить нужный фермент от сотен химически и физически сходных белков.

Классические методы очистки

Широко используются следующие методы очистки: осаждение при различных концентрациях солей (чаще всего сульфата аммония или сульфата натрия), а также органическими растворителями (ацетоном, этанолом); дифференциальная денатурация путем нагревания или изменения pH; дифференциальное центрифугирование, гель-фильтрация и электрофорез.

Для масштабной и быстрой очистки белков успешно применяются избирательная адсорбция и элюция белков с целлюлозного анионообменника диэтиламиноэтилцеллюзлозы и катионообменника карбоксиметилцеллюлозы. Широко используется также разделение белков по размерам на молекулярных ситах, например сефадексе. Эти методы являются, однако, относительно малоселективными (если они не используются в сочетании) для отделения индивидуального белка от всех остальных, находящихся в смеси. Такая задача легче решается методом аффинной хроматографии.

Типичная процедура очистки одного из ферментов печени с хорошим выходом и 490-кратной степенью очистки препарата описана в табл. 7.2. Обратите внимание на изменение при очистке удельной активности и выхода фермента. Процедура направлена на то, чтобы достичь максимальной удельной активности (число единиц активности фермента на 1 мг белка) при возможно большем выходе исходной суммарной активности.

Таблица 7.2. Типичная процедура очистки фермента

Фракция, содержащая фермент	Суммарная активность, pU	Суммарный белок, мг	Удельная активность, pU/мг	Выход, %
Грубый гомогенат печени	100 000	10 000	10	(100)
Супернатант после центрифугирования при 100 000 *g*	98 000	8000	12.2	98
Осадок, образующийся в 40—50%-ном $(NH_4)_2SO_4$	90 000	1500	60	90
Осадок, образующийся в 20—35%-ном ацетоне	60 000	250	240	60
Фракции 80—110 после хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	58 000	29	2000	58
Осадок, образующийся в 43—48%-ном $(NH_4)_2SO_4$	52 000	20	2600	52
Первая кристаллизация	50 000	12	4160	50
Перекристаллизация	49 000	10	4900	49

Метод аффинной хроматографии

Замечательным достоинством этого метода очистки является то, что он позволяет избирательно извлекать из сложной смеси белков один конкретный белок или по крайней мере небольшое их число. Метод основан на использовании иммобилизованного лиганда, который специфически взаимодействует с тем белком, который требуется получить в очищенном виде. Из всех белков, присутствующих в смеси, с этим иммобилизованным лигандом связываются только те белки, которые способны вступать с ним в сильное взаимодействие. После удаления всех прочих несвязавшихся белков нужный фермент элюируют с иммобилизованного лиганда либо концентрированными солевыми растворами, либо раствором, содержащим растворимую форму лиганда. Успешное применение метода аффинной хроматографии позволяет добиться в ходе очистки поразительных результатов, обычно превосходящих результаты последовательного применения многочисленных классических методов.

Чаще всего ферменты проявляют высокую специфичность по отношению к своим субстратам и коферментам, поэтому наиболее подходящими лигандами служат производные субстратов и коферментов, ковалентно связанные с носителем, например с сефадексом. Они могут быть присоединены к носителю либо непосредственно, либо через связующую «ножку» (линкер) из 3—8 атомов углерода. Использование линкера помогает разрешить проблемы, связанные с тем, что присоединение лиганда к носителю может препятствовать его взаимодействию с ферментом. Вместе с тем введение гидрофобного линкера иногда осложняет выделение из-за проявления эффектов хроматографии на гидрофобных лигандах (см. ниже). Примером успешного применения аффинной хроматографии может служить очистка множества различных дегидрогеназ на аффинных носителях с NAD^+ в качестве лиганда. При этом с лигандом могут связываться несколько дегидрогеназ, которые при элюировании их раствором NAD^+ выходят вместе, и их дальнейшее разделение проводят, используя уже не коферментные, а субстратные аффинные носители или применяя для элюирования «тупиковые тройные смеси», содержащие кофермент, специфический субстрат и специфический продукт.

С аффинной хроматографией во многом сходна хроматография, при которой в качестве лигандов используются красители (голубая, зеленая или красная сефароза), а также хроматография на гидрофобных лигандах, где носителем является октил- или фенилсефароза. В первом случае в качестве иммобилизованного лиганда используют органический краситель, являющийся аналогом субстрата, кофермента или аллостерического эффектора. Элюирование обычно осуществляют солевым раствором увеличивающейся концентрации.

В случае хроматографии на гидрофобных лигандах к носителю (например, сефадексу) присоединяют алкильные или арильные углеводороды. Связывание белков с такими носителями обусловлено гидрофобными взаимодействиями между алкильными цепями и гидрофобными участками белковой молекулы. Белки наносят в составе растворов с высоким содержанием соли, например $(NH_4)_2SO_4$, и элюируют раствором с понижающейся концентрацией этой же соли.

Определение гомогенности белкового препарата с помощью электрофореза в полиакриламидном геле

Гомогенность белковых препаратов лучше всего устанавливать с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в разных условиях. При одномер-

ном электрофорезе нативного белка (при наличии достаточного количества препарата) можно обнаружить как основные, так и минорные белковые примеси. В двумерном варианте (по О'Фаррелу) в одном направлении проводят разделение денатурированных белков в соответствии с их значениями pI (в присутствии мочевины) в градиенте pH, который создается полимеризованными амфолитами. Во втором направлении белки, денатурированные с помощью додецилсульфата натрия, разделяют в соответствии с размерами протомеров (если белок является олигомером).

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Пространственное распределение и клеточная компартментация ферментов, субстратов и кофакторов (см. гл. 2) имеют кардинальное значение. Например, в клетках печени ферменты гликолиза локализованы в цитоплазме, а ферменты цикла лимонной кислоты — в митохондриях.

Распределение ферментов по субклеточным органеллам изучают после предварительного фракционирования клеточных гомогенатов путем высокоскоростного центрифугирования, определяя содержание ферментов в каждой фракции (см. гл. 2).

Локализацию данного фермента в ткани или клетке часто удается установить in situ гистохимическими методами («гистоэнзимология»). Для этого тонкие (от 2 до 10 мкм) срезы замороженной ткани обрабатывают раствором субстрата, к которому специфичен данный фермент. В тех местах, где находится фермент, образуется продукт катализируемой этим ферментом реакции. Если продукт окрашен и нерастворим, он остается на месте образования и позволяет локализовать фермент. Гистоэнзимология дает наглядную и в известной мере физиологичную картину распределения ферментов.

ИЗОФЕРМЕНТЫ (ИЗОЗИМЫ)

Когда мы говорим «малатдегидрогеназа» или «глюкозо-6-фосфатаза», то обычно имеем в виду конкретный белок, обладающий ферментативной активностью, однако в действительности эти наименования охватывают все белки, катализирующие окисление малата в оксалоацетат или гидролиз глюкозо-6-фосфата с образованием глюкозы и P_i. В частности, после выделения малатдегидрогеназы из различных источников (печени крысы, *E. coli*) обнаружилось, что ферменты из печени и фермент из *E. coli*, катализирующие одну и ту же реакцию, различаются во многих отношениях по своим физическим и химическим свойствам. Физически различимые формы ферментов, обладающие одним и тем же видом каталитической активности, могут присутствовать в разных тканях одного организма, в разных типах клеток одной ткани и даже в прокариотическом организме, например в *E. coli*. Это открытие было сделано благодаря применению электрофоретических методов разделения белков, в результате чего были обнаружены электрофоретически разные формы определенной ферментативной активности.

Термин «изофермент» («изозим») охватывает все вышеупомянутые физически различимые белки с данной каталитической активностью, однако на практике, и особенно в клинической медицине, его употребляют в более узком смысле, подразумевая физически различимые и поддающиеся разделению формы данного фермента, присутствующие в различных типах клеток данного эукариотического организма, например человека. Изозимы неизменно обнаруживаются в сыворотке и в тканях всех позвоночных, насекомых и в одноклеточных организмах. При этом число ферментов и их содержание сильно варьируют. Известны изоферментные формы дегидрогеназ, оксидаз, трансаминаз, фосфатаз, трансфосфорилаз и протеолитических ферментов. В различных тканях могут находиться разные изоферменты, и эти изоферменты могут иметь неодинаковое сродство к субстратам.

Диагностическое значение изозимов

Медицинский интерес к изозимам возник после того, как было обнаружено, что **сыворотка человека содержит несколько изозимов лактатдегидрогеназы и что их относительное содержание значительно изменяется при определенных патологических состояниях.** Впоследствии было выявлено много других случаев изменения относительного содержания изозимов при разных заболеваниях.

Изозимы сывороточной лактатдегидрогеназы обнаруживаются после электрофореза при pH 8,6 на крахмальном, агаровом или полиакриламидном гелях. При указанном значении pH изозимы несут разный заряд и распределяются на электрофореграмме в пяти разных местах. Далее изозимы можно обнаружить благодаря их способности катализировать восстановление бесцветных красителей в нерастворимую окрашенную форму.

Типичный набор реагентов для обнаружения изозимов дегидрогеназы включает:

1) восстановленный субстрат (например, лактат);
2) кофермент (NAD^+);
3) краситель в окисленной форме (например, голубая нитротетразолиевая соль);
4) переносчик электронов от NADH к красителю [например, феназинметасульфат (ФМС)];
5) буфер; активирующие ионы (если требуются).

Лактатдегидрогеназа катализирует перенос двух электронов и одного иона H^+ от лактата к NAD^+

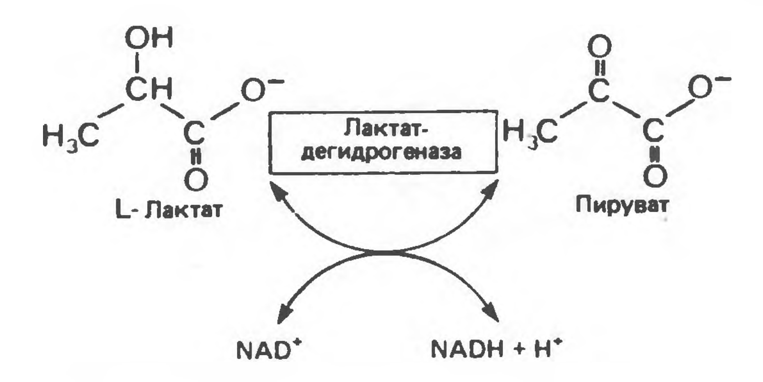


Рис. 7.8. Реакция, катализируемая L-лактатдегидрогеназой.

(рис. 7.8). Если электрофореграмму опрыскать приведенной выше смесью и затем инкубировать при 37°C, то реакция сопряженного переноса электронов будет протекать только в тех местах, где присутствует лактатдегидрогеназа (рис. 7.9). Относительную плотность окраски полос можно далее оценить количественно с помощью сканирующего фотометра (рис. 7.10). Изозим с наибольшим отрицательным зарядом обозначают I_1.

Физическая природа изозимов

Олигомерные ферменты, образованные разными протомерами, могут быть представлены несколькими формами. Часто определенная ткань продуцирует преимущественно один из протомеров. Если активный олигомерный фермент (например, тетрамер) может быть построен из таких протомеров в различных комбинациях, то образуются **изозимы**.

Изозимы лактатдегидрогеназы различаются на уровне четвертичной структуры. Олигомерная молекула лактатдегидрогеназы (мол. масса 130 000) состоит из четырех протомеров двух типов, Н и М (оба с мол. массой около 34 000). Каталитической активностью обладает только тетрамерная молекула. Если порядок соединения протомеров не имеет значения, то протомеры могут быть скомпонованы пятью способами:

НННН
НННМ
ННММ
НМММ
ММММ



Рис. 7.9. Локализация лактатдегидрогеназы на электрофореграмме с использованием системы сопряженных реакций.

Маркерт подобрал условия для разрушения и реконструкции четвертичной структуры и сумел выяснить взаимоотношения между изозимами лактатдегидрогеназы. Расщепление и реконструкция лактатдегидрогеназ I_1 и I_5 не приводят к образованию новых изозимов. Следовательно, эти два изозима содержат только один тип протомеров. Когда такой же процедуре была подвергнута смесь лактатдегидрогеназ I_1 и I_5, появились также формы I_2, I_3 и I_4. Соотношение изозимов соответствует приведенному ниже субъединичному составу:

Изозимы лактатдегидрогеназы	Субъединичный состав
I_1	НННН
I_2	НННМ
I_3	ННММ
I_4	НМММ
I_5	ММММ

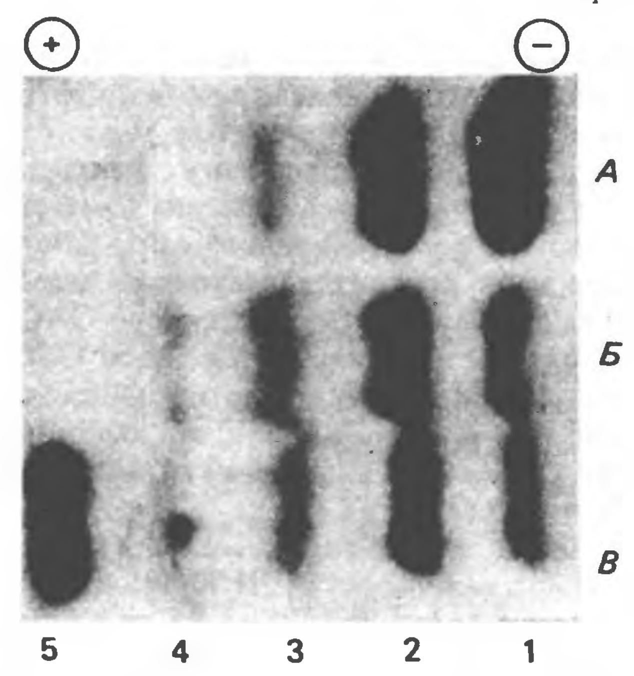
Синтез Н- и М-субъединиц детерминируется разными генетическими локусами, и они по-разному экспрессируются в разных тканях (например, в сердечной и скелетной мышцах).

ФЕРМЕНТЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Различия между функциональными и нефункциональными ферментами плазмы

Некоторые ферменты, проферменты и их субстраты в норме постоянно циркулируют в крови человека и выполняют физиологические функции. Примерами **функциональных ферментов плазмы** являются липопротеинлипаза, псевдохолинэстераза, а также проферменты компонентов систем свертывания крови и растворения кровяного сгустка. Они синтезируются в печени, и их концентрация в крови либо такая же, как в тканях, либо более высокая.

Как следует из названия, **нефункциональные ферменты плазмы** не выполняют в крови никаких известных физиологических функций. Их субстраты в плазме обычно не обнаруживаются, и в норме их концентрация в крови человека почти в миллион раз ниже, чем в тканях. Появление этих белков в плазме в повышенных концентрациях указывает на повышенную скорость деструкции тканей. Таким образом,



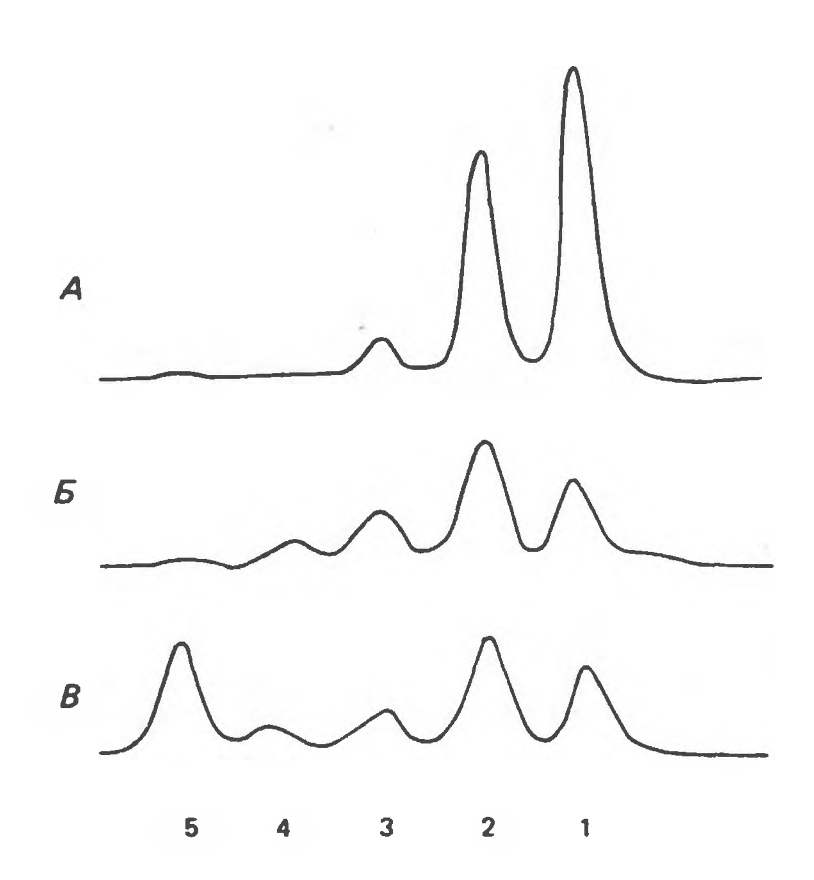


Рис. 7.10. Содержание изозимов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови в норме и патологии. Изозимы сывороточной ЛДГ разделяли методом электрофореза на ацетатцеллюлозе при pH 8,6 и выявляли с помощью реакции, в результате которой образуется краситель. Фотометрическое сканирование пятен позволяет оценить относительное содержание изозимов. *А*. Сыворотка больного инфарктом миокарда. *Б*. Сыворотка здорового человека. *В*. Сыворотка пациента с заболеванием печени. (С любезного разрешения Dr. Melvin Black and Mr. Hugh Miller, St Luke's Hospital, San Francisco.)

измерение в крови уровня нефункциональных ферментов плазмы дает врачу ценную диагностическую и прогностическую информацию.

Нефункциональные ферменты плазмы включают белковые секреты экзокринных желез и истинно внутриклеточные белки. Ферменты, выделяемые экзокринными железами,— панкреатическая амилаза, панкреатическая липаза, щелочная фосфатаза (из желчи) и кислая фосфатаза из простаты — поступают в плазму путем простой диффузии. Истинно внутриклеточные белки в норме в систему кровообращения не поступают.

Происхождение нефункциональных ферментов плазмы

Нефункциональные ферменты, обычно обнаруживаемые в плазме в малых количествах, по-видимому, появляются в ней вследствие нормально идущих процессов разрушения эритроцитов, лейкоцитов и других клеток. При ускорении гибели клеток в кровоток поступают растворимые ферменты. Именно с этим процессом обычно связывают повышение содержания ферментов в плазме, но поступлением в плазму значительных количеств мышечных ферментов сопровождается и выполнение тяжелой физической работы.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Практикующие врачи уже используют количественные определения некоторых нефункциональных ферментов плазмы. Получение этой ценной диагностической и прогностической информации теперь во многих случаях полностью автоматизировано. В табл. 7.3 приведен перечень ферментов, которые используются в диагностической энзимологии. Дальнейшие детали, касающиеся их использования, приведены в Приложении, где рассматриваются также вопросы, связанные с чувствительностью и специфичностью диагностических тестов.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ

Диагностика генетических заболеваний получила мощный стимул благодаря последним достижениям в технологии рекомбинантных ДНК. Уже давно известно, что все наследственные болезни обусловлены изменениями в ДНК, однако методы прямого определения нуклеотидной последовательности ДНК появились лишь в последнее время. Например, на основе гибридизационного поиска фрагментов ДНК (Southern, 1975) удалось разработать достаточ-

Таблица 7.3. Основные ферменты сыворотки, используемые в клинической диагностике. Многие из приведенных ферментов не являются специфичными для указанных в таблице заболеваний; дополнительные данные об условиях, при которых активность этих ферментов изменяется, приведены в Приложении

Фермент	Заболевание
Аминотрансферазы	
Аспартатаминотрансфераза	Инфаркт миокарда
Аланинаминотрансфераза	Вирусный гепатит
Амилаза	Острый панкреатит
Церулоплазмин	Гепатолентикулярная дегенерация (болезнь Вилсона)
Креатинфосфокиназа	Заболевание мышц и инфаркт миокарда
γ-Глутамилтранспептидаза	Различные заболевания печени
Лактатдегидрогеназа (изозимы)	Инфаркт миокарда
Липаза	Острый панкреатит
Кислая фосфатаза	Метастазирующая карцинома предстательной железы
Щелочная фосфатаза (изозимы)	Различные заболевания костей, закупорка протоков печени

но чувствительный метод пренатального скрининга наследственных нарушений; с этой целью с помощью ферментов рестрикции проводят картирование ДНК, извлеченной из зародышевых клеток, находящихся в амниотической жидкости.

В принципе можно сконструировать пробы ДНК для диагностики большей части генетических заболеваний. Например, для пренатального выявления талассемии (нарушения в синтезе субъединиц гемоглобина; см. гл. 6) можно синтезировать пробу ДНК по фрагменту гена, кодирующего нормальную субъединицу гемоглобина, и с ее помощью выявить укорочение или отсутствие рестрикционного фрагмента, обусловленное делецией в этом гене. Именно такие делеции характерны для некоторых видов α-талассемии и нескольких редких типов β- и β,δ-талассемии (Dozy, Forman, Abuelo, 1979; Kan, Chang, Dozy, 1982). Предложен и альтернативный подход, основанный на конструировании синтетической кДНК, гибридизующейся с β-глобиновой последовательностью, которая содержит нонсенс-мутацию, характерную для некоторых видов β-талассемии (Pirastu et al., 1984). Отсутствие в плазме α_1-антитрипсина — ингибитора протеаз — приводит к развитию эмфиземы и раннему циррозу печени. Неактивный α_1-антитрипсин был обнаружен с помощью ДНК-зонда, сконструированного на основе неактивного мутантного аллеля гена α_1-антитрипсина (Kidd et al., 1983).

Гибридизационные зонды могут использоваться также для обнаружения генетических изменений, ведущих к потере рестрикционного сайта (см. гл. 38). Например, при серповидноклеточной анемии наблюдается точечная мутация в кодоне GAG (Glu), в результате которой появляется кодон GTG (Val); такую мутацию в β-глобиновом гене можно обнаружить, взяв для анализа всего 10 мл амниотической жидкости и используя эндонуклеазу рестрикции Mst II или Sau I (Orkin et al., 1982).

ДНК-зонды можно использовать и для обнаружения последовательностей ДНК, прочно сцепленных с интересующим нас геном, но не принадлежащих самому этому гену. Подобный анализ может применяться и для выявления хромосомного полиморфизма (различий в последовательностях гомологичных хромосом). Расщепление ДНК эндонуклеазой рестрикции дает в таких случаях неодинаковые рестрикционные карты (наборы фрагментов ДНК), свидетельствующие о различиях в последовательностях оснований гомологичных генов. Это явление получило название полиформизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). При рестрикционном анализе обнаруживаются две гибридизационные полосы (если бы гены были идентичны, наблюдалась бы только одна полоса). У потомков, унаследовавших дефектную хромосому, тоже выявляется одна гибридизационная полоса, но ее положение отличается от положения полосы нормальных хромосом. Феномен ПДРФ применялся и для обнаружения гена серповидноклеточной анемии (сцепленного с сайтом рестрикции Hpa I), а также β-талассемии (сцепленного с сайтами рестрикции Hind III и Bam H1) (Little et al., 1980; Woo et al., 1983).

Скрининг, основанный на полиморфизме рестрикционных фрагментов, использовался также для ранней диагностики фенилкетонурии (Woo et al., 1983) (см. гл. 31). Отметим, однако, что сам ген, ответственный за фенилкетонурию, не влияет на распределение рестрикционных фрагментов, однако он тесно сцеплен с сайтом рестрикционного полиморфизма. Перспективы использования полиморфизма рестрикционных фрагментов могут быть связаны с поисками генов, ответственных за то или иное заболевание, которые сцеплены с полиморфным участком. Этот подход уже применялся для скрининга мутаций, приводящих к развитию ретинобластомных опухолей (Cavenee et al., 1983) и болезни Гентингтона (Gusella et al., 1984).

Дальнейшие примеры использования рестрикционных фрагментов в целях диагностики будут даны в гл. 36.

ЛИТЕРАТУРА

Общая энзимология

Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (eds.) The Enzymes, 3rd ed., 7 vols, Academic Press, 1970—1973.

Nord F. F. (ed.) Advances in Enzymology, Interscience. [Issued annually.]

Структура ферментов

Fersht A. Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed., Freeman, 1985.

Hirs C. H. W., Timascheff S. N. (eds.) Enzyme structure. Parts A—H. In: Methods in Enzymology, Vol. 11, 1967; Vols 25 and 26, 1972; Vol. 27, 1973; Vol. 47, 1977; Vols. 48 and 49, 1978; Vol. 49, 1979. Academic Press.

Коферменты

McCormick D. B., Wright L. D. (eds.) Vitamins and coenzymes, Parts A—F. In: Methods in Enzymology, Vol. 18A, 1970; Vols 18B and 18C, 1971; Vol. 62, 1979; Vols 66 and 67, 1980. Academic Press.

Номенклатура

Enzyme Nomenclature, 1978. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes, Academic Press, 1979.

Оценка содержания и очистка ферментов

Bergmeyer H.-U. (ed.). Methods of Enzymatic Analysis, 2nd English ed. 4 vols, Academic Press, 1974.

Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (eds.). The Enzymes, 3rd ed. 7 vols, Academic Press, 1970—1973.

Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds.). Methods in Enzymology, 69 vols, Academic Press, 1955—1987.

Hoffmann-Ostenhoff O. et al. Affinity Chromatography. Pergamon Press, 1978.

Jacoby W. B. (ed.) Enzyme purification and related techniques. In: Methods in Enzymology, Vol. 22, Academic Press, 1971.

Jacoby W. B., Wilchek M. (eds.). Affinity techniques. In: Methods in Enzymology, Vol. 34, 1974; Vol. 46, 1977, Academic Press.

Mosbach K. (ed.). Immobilized enzymes. In: Methods in Enzymology, Vol. 44, Academic Press, 1976.

Внутриклеточное распределение ферментов

DePierre J. W., Ernster L. Enzyme topology of intracellular membranes, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 201.

Клиническая энзимология

Bergmeyer H. U. Aspartate aminotransferase, Test of the Month 6, 1980, No. 2.

Bergström K. Determination of serum alkaline phosphatase activity, Test of the Month 1, 1974, No. 22.

Cavanee W. K. et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastomas, Nature, 1983, **305**, 779.

Dozy A. M., Forman E. N., Abuelo D. N. Prenatal diagnosis of homozygous α-thalassemia, JAMA, 1979, 241, 1610.

Fishinger A. F. Creatine phosphokinase and its izoenzymes, Test of the Month 2, 1976, No. 6.

Gusella J. F. et al. DNA markers for nervous system diseases, Science, 1984, **225**, 1320.

Kan Y. W., Chang J., Dozy A. M. Pages 275—283. In: Thalassemia: Recent Advances in Detection and Treatment, Cao A., Carcassi U., Rowley P. (eds.), A. R. Liss, 1982.

Kidd V. J. et al. α_1-Antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene, Nature, 1983, **304**, 230.

Little P. F. R. et al. Model for antenatal diagnosis of β-thalassemia and other monogenic disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms, Nature, 1980, **285**, 144.

McNair R. D. Lactate dehydrogenase, Test of the Month 2, 1976, No. 3.

Orkin S. H. et al. Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis: Application to prenatal diagnosis, N. Engl. J. Med., 1982, **307**, 32.

Pirastu M. et al. Multiple mutations produce $\delta\beta^0$-thalassemia in Sardinia, Science, 1984, **223**, 929.

Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., 1975, **98**, 503.

Wilkinson J. H. Clinical applications of isozymes, Clin. Chem., 1970, **16**, 733.

Wilkinson J. H. Clinical significance of enzyme activity measurements, Clin. Chem., 1970, **16**, 882.

Woo S. L. C. et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria, Nature, 1983, **306**, 151.

Глава 8

ФЕРМЕНТЫ: КИНЕТИКА

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих главах мы рассмотрели физические и химические свойства белков и связь структуры белка с его функцией. В гл. 5 и 11 обсуждаются общие свойства ферментов и энергетические изменения, обычно сопровождающие биохимические реакции, бóльшую часть которых катализируют специфические ферменты. В этой главе мы рассмотрим химическую природу ферментативного катализа и природу фермент-субстратных взаимодействий, ответственных за специфичность этих биологических катализаторов.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Из всех тех факторов, от которых зависит определение активности фермента — концентрация фермента и субстрата, температура, pH и присутствие ингибиторов,— наибольший клинический интерес представляют последние три. Активность ферментов растет с повышением температуры, поэтому скорость метаболических процессов значительно повышается при лихорадке. Если температура в конце концов не понизится, последствия будут фатальны. С другой стороны, понижение температуры тела (гипотермия) — и, следовательно, понижение активности большинства ферментов — весьма полезно в тех случаях, когда требуется снизить общие метаболические потребности (например, при операции на сердце или транспортировке органов для трансплантационной хирургии). Кардинальным биологическим принципом является гомеостаз — поддержание внутренней среды организма в состоянии, максимально близком к норме. Активность многих ферментов и белков изменяется даже при сравнительно небольших изменениях pH. Большинство лекарственных препаратов оказывает свое действие, влияя на соответствующие ферментативные реакции. Многие такие препараты сходны с природными субстратами и потому могут действовать как конкурентные ингибиторы ферментов. Чтобы понять многие процессы, которые существенны для фармакологии и токсикологии, необходимо иметь четкое представление о механизмах ингибирования ферментов.

ОБРАЗОВАНИЕ И РАСПАД ПЕРЕХОДНЫХ СОСТОЯНИЙ

Рассмотрим реакцию замещения, в которой приходящая группа Y замещает уходящую группу X:

$$Y + R - X \rightleftarrows Y - R + X.$$

Эта реакция состоит из двух полуреакций: 1) образование **переходного состояния**, в котором к группе R присоединен и Y, и X; 2) распад переходного состояния с образованием продуктов:

$$Y + R - X \rightleftarrows \underbrace{Y\cdots R\cdots X}_{\text{Переходное состояние}} \rightleftarrows Y - R + X.$$

Каждая из полуреакций, как и любая другая химическая реакция, характеризуется определенным изменением свободной энергии. Обозначим через ΔG_F изменение свободной энергии, связанное с **образованием** переходного состояния, а через ΔG_D изменение свободной энергии, связанное с его **распадом** и образованием продуктов:

$$\Delta G_F = \Delta G_F^0 + RT \ln \frac{[Y\cdots R\cdots X]}{[Y][R-X]},$$

$$\Delta G_D = \Delta G_D^0 + RT \ln \frac{[Y-R]\ [X]}{[Y\cdots R\cdots X]}.$$

Суммарное изменение свободной энергии **полной** реакции, ΔG, равно сумме изменений свободной энергии каждой из полуреакций:

$$\Delta G = \Delta G_F + \Delta G_D.$$

Как и в любом уравнении, где есть два слагаемых, невозможно лишь по алгебраическому знаку и величине ΔG установить знак или величину ΔG_F и ΔG_D. Иначе говоря, мы не можем, зная изменение свободной энергии полной реакции ΔG, сказать что-либо об изменениях свободной энергии, связанных с образованием и распадом переходных состояний. Поскольку катализ теснейшим образом связан со

значениями ΔG_F и ΔG_D, ясно, что термодинамические параметры полной реакции (ΔG) ничего не говорят нам о **пути** реакции (т.е. о ее механизме). Этот вопрос и является предметом кинетики.

ИЗМЕНЕНИЯ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ, СВЯЗАННЫЕ С ОБРАЗОВАНИЕМ И РАСПАДОМ ПЕРЕХОДНЫХ СОСТОЯНИЙ

Сформулированные выше положения проиллюстрированы графически на рис. 8.1 и 8.2; на этих рисунках изображены «профили реакций», которые отражают связь между ΔG, ΔG_F и ΔG_D. Обратите внимание, что ΔG на рис. 8.1 отрицательно ($\Delta G < 0$), а на рис. 8.2 положительно ($\Delta G > 0$); тем не менее в обоих случаях ΔG_F положительно ($\Delta G_F > 0$), а ΔG_D отрицательно ($\Delta G_D < 0$). Следовательно, как и было сказано, **знак и величина** ΔG еще ничего не говорят о знаке и величине ΔG_F или ΔG_D.

РОЛЬ КАТАЛИЗАТОРОВ В ОБРАЗОВАНИИ ПРОДУКТИВНЫХ ПЕРЕХОДНЫХ СОСТОЯНИЙ

Рассмотрим профили реакций, различающихся только образованием двух разных переходных состояний (рис. 8.3).

В обоих случаях величина свободной энергии образования переходного состояния характеризует энергетический барьер полной реакции. Но энергетический барьер реакции, проходящей через переходное состояние [Y···R···X]^b, ниже, чем энергетический барьер реакции, проходящей через переходное состояние [Y···R···X]^a. В приведенном выше примере [Y···R···X]^a представляет собой переходное состояние **некатализируемой** реакции, тогда как [Y···R···X]^b — это переходное состояние **катализируемой** реакции. Все катализаторы, включая и ферменты, **уменьшают свободную энергию образования переходного состояния** ΔG_F. Заметим далее, что на величину ΔG катализатор не влияет: **изменение свободной энергии полной реакции не зависит от присутствия катализаторов.** Константа равновесия химической реакции является функцией изменения стандартной свободной энергии этой реакции:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}.$$

Отсюда следует, что **ферменты и другие катализаторы не влияют на константу равновесия реакции.**

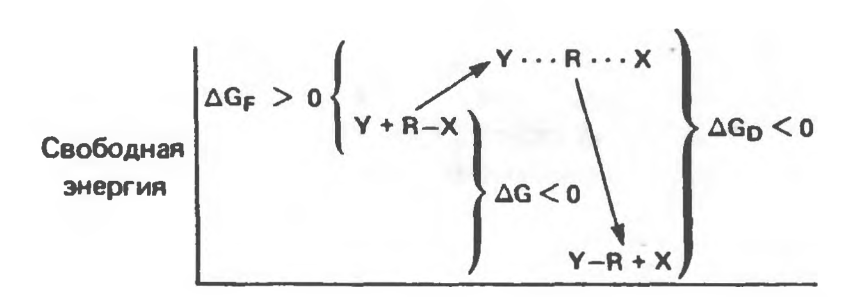


Рис. 8.1. Энергетический профиль реакции замещения, для которой характерно отрицательное изменение свободной энергии ($\Delta G < 0$).

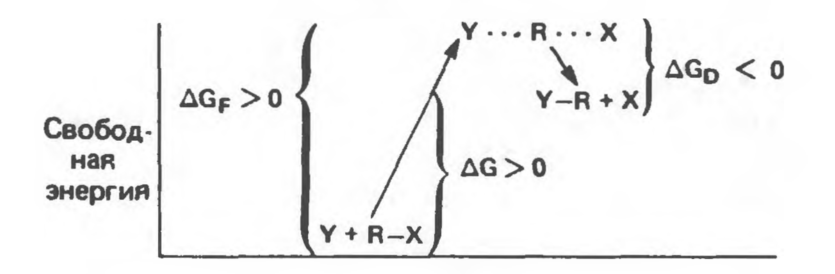


Рис. 8.2. Энергетический профиль реакции замещения, для которой характерно положительное изменение свободной энергии ($\Delta G > 0$).

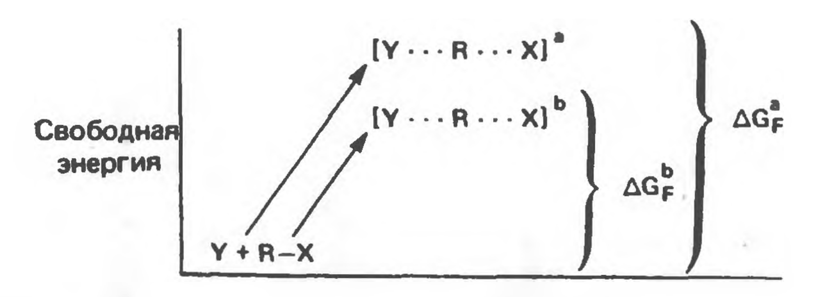


Рис. 8.3. Энергетические профили реакции, в ходе которых могут образовываться два разных переходных состояния. [Y··· R··· X]^a и [Y··· R··· X]^b. ΔG_F^a и ΔG_F^b — свободная энергия образования указанных комплексов.

ТЕОРИЯ СТОЛКНОВЕНИЙ

Кинетическая теория, или **теория столкновений**, основывается на двух ключевых положениях.

1. Для протекания реакции молекулы должны сталкиваться друг с другом, т.е. сближаться на расстояния, достаточные для образования связей.

2. Чтобы столкновение было продуктивным (т.е. приводило к протеканию реакции), реагирующие молекулы должны обладать энергией, достаточной для преодоления энергетического барьера.

Отсюда следует, что при наличии у реагирующих молекул достаточной энергии все факторы, повышающие частоту их столкновений, будут повышать скорость реакции. И наоборот, факторы, понижающие частоту столкновений молекул или их кинетическую энергию, снижают скорость реакции.

Если не все молекулы в популяции обладают энергией, достаточной для осуществления реакции, то повышение температуры, сопровождающееся увеличением кинетической энергии молекул, приведет к повышению скорости реакции. Эти положения схематически иллюстрирует рис. 8.4. В случае *А* ни одна из молекул, в случае *Б* — часть, а в случае *В* — все молекулы обладают кинетической энергией, достаточной для преодоления энергетического барьера.

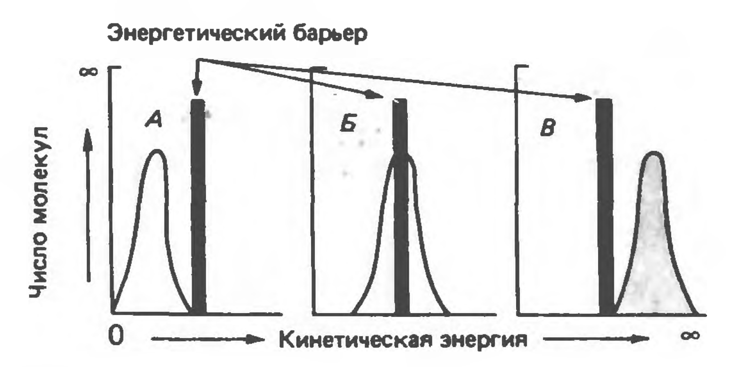


Рис. 8.4. Концепция энергетического барьера химической реакции.

В'отсутствие ферментов многие химические реакции при температуре, характерной для живых клеток, идут исключительно медленно. Однако даже и при этой температуре молекулы находятся в движении и сталкиваются друг с другом. Правда, **они не могут реагировать быстро, поскольку большинство из них не обладает достаточной кинетической энергией для преодоления энергетического барьера.** При достаточно большом повышении температуры (т. е. при повышении кинетической энергии) реакция пойдет быстрее. То, что реакция вообще идет (т. е. протекает самопроизвольно), следует из условия $\Delta G < 0$, но при низких температурах она идет медленно. **Ферменты ускоряют реакции, протекающие самопроизвольно при условиях, преобладающих в живых клетках.**

РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ В РАЗРЫВЕ И ОБРАЗОВАНИИ КОВАЛЕНТНЫХ СВЯЗЕЙ

Большинство химических реакций, представляющих биохимический интерес, сопряжено с разрывом или образованием ковалентных связей. Рассмотрим, например, реакцию переноса, о которой говорилось в гл. 7:

$$D - G + A \rightleftarrows A - G + D,$$

в которой группа G переносится с донора, D – G, на акцептор A. Полная реакция включает как разрыв связи D – G, так и образование новой связи, A – G. Однако если реакция переноса катализируется ферментом, ее лучше записывать следующим образом:

D–G ⟶ Enz ⟵ A–G
D ⟵ Enz–G ⟶ A

Такое ее представление подчеркивает три важных признака ферментативных реакций переноса групп.

1. Каждая полуреакция сопровождается и разрывом, и образованием ковалентной связи.

2. Фермент является равноправным реагентом, таким же как D – G и A.

3. В то время как в полной реакции фермент выполняет функцию катализатора (т. е. он требуется лишь в следовых количествах и возвращается в исходное состояние по окончании реакции), в каждой из полуреакций фермент выступает как стехиометрический реагент (т. е. реагирует с другими реагентами в молярном отношении 1:1).

Многие другие биохимические реакции можно рассматривать как частные случаи реакций переноса, в которых отсутствуют либо A, либо D, либо оба реагента. Так, реакцию изомеризации (например, взаимопревращение глюкозо-6-фосфата и глюкозо-1-фосфата) можно представить как реакцию переноса, в которой отсутствуют D и A:

S ⟶ Enz ⟶ P
Enz–S

В таком представлении, однако, теряется из виду еще одно ключевое свойство ферментативных реакций — **участие в полной реакции двух и более форм комплекса Enz – S и последовательное протекание нескольких стадий реакции.** Для того чтобы отразить это свойство, реакцию переноса можно представить в следующем виде:

D–G ⟶ Enz ⟵⟶ A–G
D ⟵ Enz–G ⟶ Enz–G* ⟶ Enz–G** ⟶ A

где Enz – G, Enz – G* и Enz – G** — формы комплекса Enz – S, последовательно образующиеся в ходе полной реакции.

Из всего сказанного выше ясно, что для протекания реакции необходимо, чтобы все участвующие в ней реактанты сближались на расстояния, достаточные для образования (или для разрыва) связей, т. е. сталкивались друг с другом. В химии гомогенных растворов концентрация реагирующих молекул в отсутствие катализаторов считается постоянной во всем растворе. Однако в присутствии катализатора это условие перестает соблюдаться. Для эффективной работы катализатор должен иметь на своей поверхности участки связывания реагирующих молекул. Такое связывание представляет собой обратимый процесс, однако равновесие сильно сдвинуто в сторону образования комплекса. Качественно это можно представить следующим образом:

Реактант + Катализатор ⇄ Комплекс реактанта с катализатором.

Прочность комплекса реактанта R и катализатора C можно охарактеризовать количественно с помощью константы диссоциации комплекса R – C (K_d)

или константы равновесия реакции:

$$R - C \rightleftarrows R + C,$$

$$K_d = \frac{[R][C]}{[R - C]}.$$

Таким образом, чем прочнее комплекс R – C, тем меньше K_d.

Отсюда мы получаем одно важное следствие: **связывание реактанта с катализатором приводит к заметному повышению локальной концентрации реагента по сравнению с его концентрацией во всем растворе.** Таким образом, мы переходим из области химии гомогенных растворов в область химии гетерогенных растворов.

Если катализатор биомолекулярной реакции (идущей с участием двух реактантов) связывает оба реактанта, то локальная концентрация каждого из них повышается, причем степень этого повышения зависит от сродства катализатора к данному реактанту (K_d). Как мы увидим ниже, скорость бимолекулярной реакции

$$A + B \rightarrow A - B$$

пропорциональна концентрации **обоих** реактантов, А и В, поэтому связывание А и В с катализатором может приводить к чрезвычайно большому (в несколько тысяч раз) увеличению скорости реакции.

Одним из ключевых факторов, позволяющих ферменту служить катализатором, является его способность эффективно связывать один или (чаще) оба реактанта, участвующие в бимолекулярной реакции, что приводит к повышению локальной концентрации реактантов и, следовательно, к локальному повышению скорости реакции. То обстоятельство, что ферменты по сравнению с большинством небелковых катализаторов необычайно эффективны и высокоизбирательны, требует дальнейшего объяснения. Чтобы понять эти отличительные свойства ферментов, мы должны ввести понятие активного, или каталитического, центра [1].

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

Размеры белков намного превышают размеры низкомолекулярных субстратов, в связи с чем возникло представление о том, что в катализе участвует лишь ограниченная область молекулы фермента. Эту область мы и называем **каталитическим центром.** Вначале было непонятно, почему молекулы ферментов столь велики, если только часть их структуры участвует в связывании субстрата и непосредственно в катализе. Однако, как показал анализ трехмерной структуры ферментов, с субстратом взаимодействует намного бóльшая часть белковой молекулы, чем предполагалось ранее. Если еще учесть включение в работу ферментов аллостерических центров такого же размера (см. гл. 10), не приходится удивляться объемности ферментов.

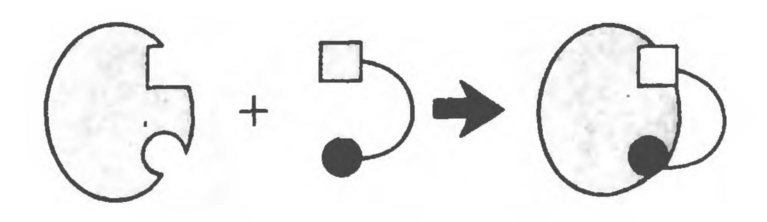


Рис. 8.5. Образование комплекса Enz — S согласно модели «жесткой матрицы» Фишера.

Модель «ключ — замок»

Первоначальная модель каталитического центра, предложенная Эмилем Фишером, трактовала взаимодействие субстрата и фермента по аналогии с системой **«ключ — замок»**. Эта модель, которую иногда называют моделью **«жесткой матрицы»** (рис. 8.5), не утратила своего значения для понимания некоторых свойств ферментов, например их способности к строго определенному связыванию двух или большего числа субстратов (рис. 8.6), или для объяснения кинетики насыщения субстратом.

Модель индуцированного соответствия

Недостатком модели Фишера является подразумеваемая в ней жесткость каталитического центра. Более общий характер имеет **модель индуцированного соответствия**, предложенная Кошландом. Эта модель основывается на весьма убедительных экспериментальных данных. Ее существенной чертой является гибкость каталитического центра. В модели Фишера каталитический центр считается заранее подогнанным под форму молекулы субстрата. В модели

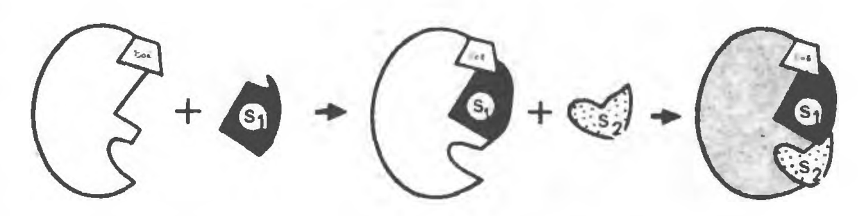


Рис. 8.6. Последовательное связывание ферментом кофермента (CoE) и двух субстратов (S_1 и S_2) в рамках гипотезы «жесткой матрицы». Предполагается, что кофермент содержит участок, способный связывать первый субстрат (S_1); после связывания первого субстрата облегчается связывание второго субстрата S_2.

[1] Во многих руководствах понятия «активный центр» и «каталитический центр» рассматриваются как синонимы, однако некоторые ферменты имеют дополнительные «активные центры», предназначенные для регуляции активности фермента и непосредственно не связанные с химическими превращениями на различных стадиях каталитического процесса. Поэтому, чтобы избежать неоднозначности, мы используем термин «каталитический центр».

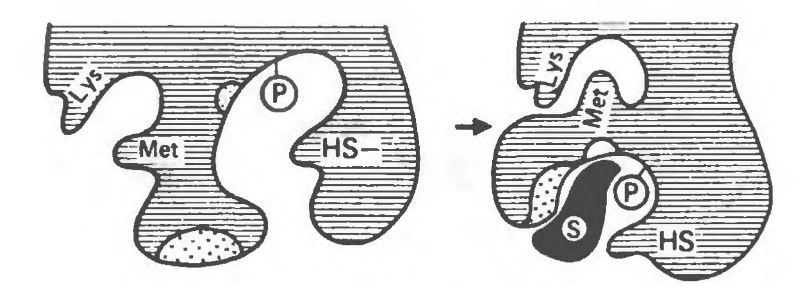


Рис. 8.7. Схематическое представление конформационных изменений в молекуле фермента при связывании субстрата согласно модели индуцированного соответствия. Обратите внимание на расположение ключевых остатков до и после связывания субстрата (по Кошланду).

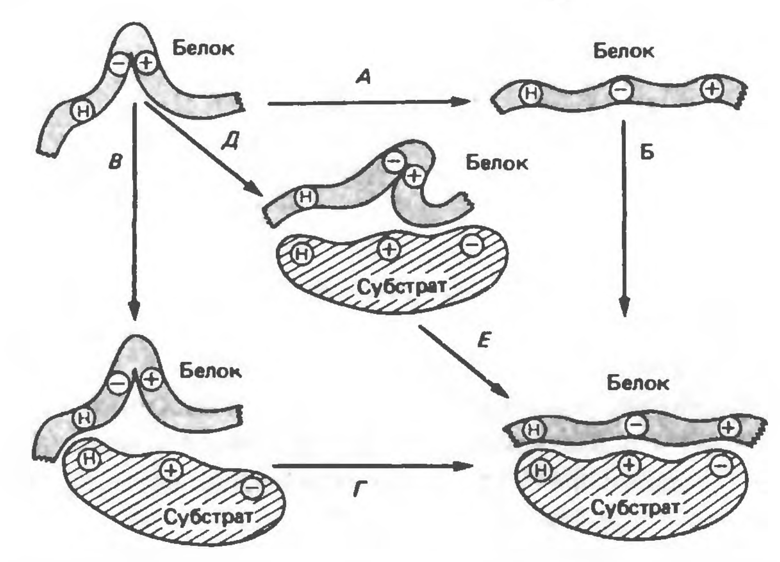


Рис. 8.9. Схема альтернативных путей реакции при индуцировании субстратом конформационных изменений в ферменте. Фермент сначала претерпевает конформационное изменение (*А*), затем связывает субстрат (*Б*). На альтернативном пути фермент сначала связывает субстрат (*В*), а затем претерпевает конформационное изменение (*Д*). Наконец, оба процесса могут развиваться согласованным образом (*Г*) с образованием конечной конформации (*Е*).

же индуцированного соответствия субстрат индуцирует конформационные изменения фермента, и лишь в результате этих изменений аминокислотные остатки и другие группы фермента принимают пространственную ориентацию, необходимую для связывания субстрата и катализа. При этом другие аминокислотные остатки могут погрузиться в глубь молекулы фермента.

В примере, приведенном на рис. 8.7, в связывании субстрата принимают участие гидрофобные и заряженные группы (области, выделенные точками). Непосредственно в катализе участвуют остаток фосфосерина (Р) и – SH-группа цистеина. Другие остатки, не вовлеченные ни в тот, ни в другой процесс, представлены остатками Lys и Met. В отсутствие субстрата каталитические и субстратсвязывающие группы находятся друг от друга на расстоянии, в несколько раз превышающем длину связи. Субстрат по мере сближения с ферментом индуцирует в последнем конформационные изменения, в результате которых соответствующие группы занимают положение, необходимое для связывания субстрата и для катализа. Одновременно меняется пространственное расположение других остатков — Lys и Met теперь оказываются сближенными (рис. 8.7).

Аналоги субстрата тоже могут вызывать конформационные изменения, но не все из них являются «правильными» (рис. 8.8). При связывании истинного субстрата (*А*) все группы (черные кружочки) занимают нужное положение. При связывании же аналога субстрата — более объемного (рис. 8.8,*Б*) или, наоборот, меньшего по размеру (рис. 8.8,*В*) —

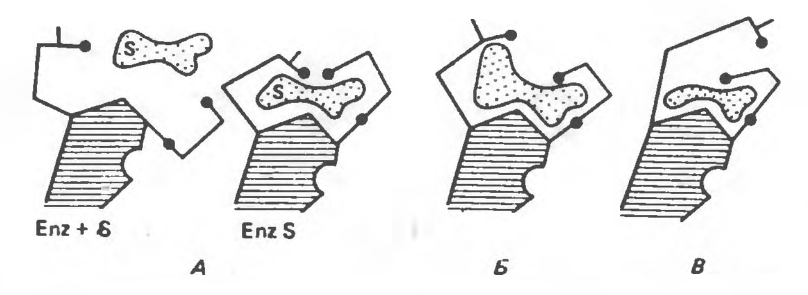


Рис. 8.8. Схематическое представление конформационных изменений в ферменте при связывании истинного субстрата (*А*) и его аналогов (*Б*, *В*).

индуцируется неправильное расположение этих групп. Еще одной структурной особенностью фермента является небольшая выемка в правой части. Представим, что в эту выемку попадает регуляторная молекула, «удерживающая» один из полипептидных участков, который несет каталитическую группу, от перемещения. Тогда будет происходить лишь связывание субстрата, но не катализ.

Остается выяснить точную последовательность событий, из которых складываются индуцированные субстратом конформационные изменения. Здесь возможно несколько путей, представленных на рис. 8.9.

Предположим, что нам известна полная первичная структура фермента. Даже в этом случае обычно бывает трудно решить, из каких именно остатков формируется каталитический центр. Как явствует из модели индуцированного соответствия, эти остатки могут располагаться далеко один от другого в первичной структуре, но быть сближены в трехмерной (третичной) структуре.

В формировании каталитического центра принимают участие аминокислотные остатки нескольких сегментов полипептидной цепи, как в случае гемоглобина (гл. 6) или химотрипсина (гл. 9).

Каталитический центр лизоцима

Лизоцим присутствует в составе слез, носовой слизи, слюны, желудочного секрета, в различных тканях, а также в молоке и яичном белке. Этот фермент катализирует гидролиз β-1,4-связей N-ацетилнейраминовой кислоты (см. гл. 13 и 33), входящей в состав протеогликанов и глюкозаминогликанов. Лизоцим, присутствующий в слезах и носовой

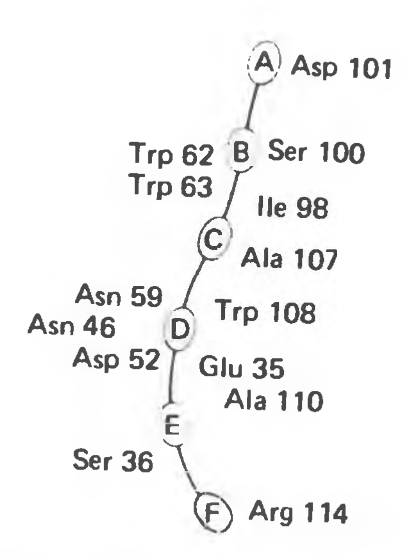


Рис. 8.10. Схематическое представление каталитического центра, расположенного в щели, которая проходит посредине молекулы лизоцима. Гликозильные звенья гексасахарида обозначены буквами от А до F. Указаны некоторые остатки, выстилающие щель активного центра, и их номера в аминокислотной последовательности лизоцима.

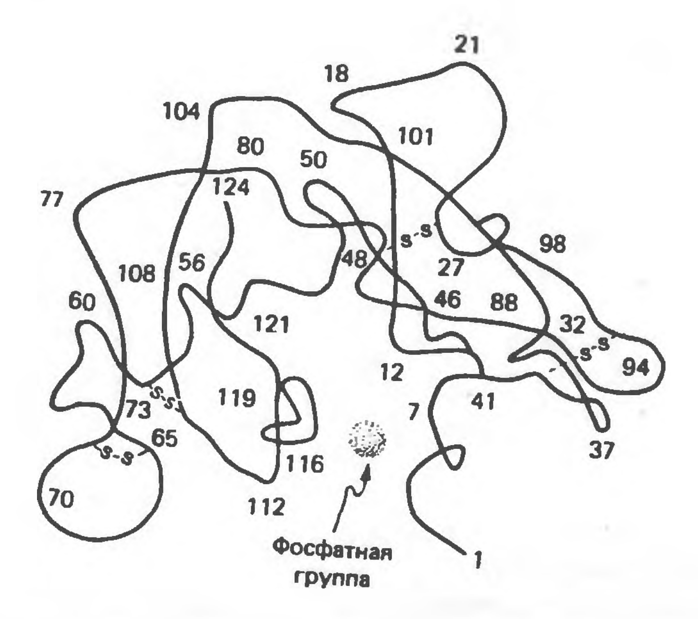


Рис. 8.11. Структура рибонуклеазы по данным рентгеноструктурного анализа. Указаны номера специфических остатков. (См. также рис. 5.7.)

слизи, разрушает клеточные стенки многих попадающих из воздуха грамположительных бактерий. Лизоцим (мол. масса около 15 000) образован одной полипептидной цепью, содержащей 129 остатков. Поскольку в составе молекулы нет ни кофермента, ни ионов металлов, катализ, специфичность и трехмерная структура лизоцима целиком определяются аминокислотной последовательностью. В молекуле имеются небольшие области складчатого слоя, несколько коротких α-спиралей и достаточно большие участки с нерегулярной структурой. Цветной снимок трехмерной модели лизоцима в комплексе с субстратом можно найти в работе J. Biol. Chem. 1968: **243**, 1663. Посредине молекулы лизоцима проходит глубокая щель, в которой находятся остатки, формирующие каталитический центр и субстратсвязывающую область; последняя содержит шесть участков, взаимодействующих с разными субстратами или ингибиторами (рис. 8.10). Остатки, ответственные за расщепление связи, располагаются между участками D и E; наиболее важную роль играют карбоксильные группы остатков Asp 52 и Glu 35. Последний, по всей вероятности, протонирует гликозидную связь субстрата, а отрицательно заряженный остаток Asp 52, располагающийся на противоположной стороне, стабилизирует образующийся в результате карбониевый ион.

Каталитический центр рибонуклеазы

В отличие от ситуации с лизоцимом информация о каталитическом центре рибонуклеазы была в значительной мере получена еще до определения ее трехмерной структуры. Выводы, основанные на химических исследованиях, подтверждены кристаллографическими данными. В молекуле рибонуклеазы тоже имеется щель, сходная со щелью в лизоциме, в которую выступают два остатка, His 12 и His 119. Из полученных ранее химических данных следовало, что эти остатки входят в состав каталитического центра. Оба они располагаются вблизи места связывания уридиловой кислоты (рис. 8.11).

Аминокислотные последовательности в области каталитического центра

Первичная структура в окрестности каталитического центра у различных семейств гидролитических ферментов оказывается довольно близкой (табл. 8.1). Это позволяет предполагать, что механизмы гидролиза связей в биологических системах относительно немногочисленны. Поэтому неудивительно, что аминокислотные последовательности в области каталитического центра у одного и того же фермента, выделенного из разных видов, еще более сходны.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Ферментативная активность зависит в основном от следующих факторов: концентрация фермента и субстрата, температура, pH, присутствие ингибиторов.

ТЕМПЕРАТУРА

В некотором ограниченном интервале температур скорость ферментативной реакции повышается с ростом температуры. Коэффициент, указываю-

Таблица 8.1. Аминокислотные последовательности вблизи важных в каталитическом отношении остатков серина (S) и гистидина (H) в нескольких бычьих протеазах. Использованы однобуквенные обозначения аминокислот (гл. 3). (Из работы Dayhoff M. O., ed.: Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5. National Biomedical Research Foundation, 1972, с разрешения.)

Фермент	Аминокислотные остатки вблизи серина (S)	Аминокислотные остатки вблизи гистидина (H)
Трипсин	DSCQDG(S)GGPVVCSGK	VVSAA(H)CYKSG
Химотрипсин A	SSCMGD(S)GGPLVCKKN	VVTAA(H)GGVTT
Химотрипсин B	SSCMGD(S)GGPLVCQKN	VVTAA(H)CGVTT
Тромбин	DACEGD(S)GGPFVMKSP	VLTAA(H)CLLYP

щий, во сколько раз повышается скорость реакции при повышении температуры на 10°, называется **температурным коэффициентом** и обозначается Q_{10}. Для многих биологических реакций при повышении температуры на 10° скорость удваивается ($Q_{10} = 2$) и, аналогично, при понижении температуры на 10° уменьшается вдвое. Многие физиологические процессы (например, скорость сокращения изолированной сердечной мышцы) тоже характеризуются коэффициентом Q_{10}, близким к двум.

Типичная зависимость скорости ферментативной реакции от температуры представлена на рис. 8.12. Видно, что при некой оптимальной температуре скорость реакции максимальна. Повышение скорости реакции по мере приближения к оптимальной температуре слева объясняется увеличением кинетической энергии реагирующих молекул. При дальнейшем повышении температуры кинетическая энергия молекулы фермента становится достаточной для разрыва связей, поддерживающих вторичную структуру фермента в нативном, каталитически активном состоянии (происходит тепловая денатурация фермента). Вторичная и третичная структура фермента разрушается, что сопровождается потерей каталитической активности.

Для большинства ферментов оптимальная температура равна или выше той температуры, при которой в норме находятся клетки. Для ферментов микроорганизмов, адаптировавшихся к обитанию в природных горячих источниках, оптимальная температура может быть близка к точке кипения воды.

pH

Умеренные изменения pH оказывают влияние на **ионное состояние фермента**, а зачастую и субстрата. Как показывают измерения ферментативной активности при различных pH, оптимум активности находится обычно между pH 5,0 и 9,0. Вместе с тем отдельные ферменты, например пепсин, активны при значениях pH, лежащих далеко за пределами этого интервала.

Зависимость активности от pH определяется следующими факторами.

1. **Денатурацией фермента** при очень высоких или очень низких pH.

2. **Изменением величины заряда молекул субстрата или фермента.** Активность фермента может изменяться в результате изменений либо его структуры, либо заряда функциональных остатков, участвующих в катализе или связывании субстрата. Рассмотрим для примера взаимодействие отрицательно заряженного фермента (Enz^-) с положительно заряженным субстратом (SH^+):

$$Enz^- + SH^+ \rightarrow Enz - SH.$$

При низких pH происходит протонирование Enz^-:

$$Enz^- + H^+ \rightarrow EnzH,$$

а при высоких pH — депротонирование субстрата:

$$SH^+ \rightarrow S + H^+.$$

Поскольку взаимодействовать друг с другом могут только SH^+ и Enz^-, при крайних значениях pH эффективная концентрация Enz^- или SH^+ будет низкой, что приведет к снижению скорости реакции (рис. 8.13). И только в области, выделенной двойной штриховкой, в нужном ионном состоянии находятся одновременно и Enz, и S, а максимальной концентрации они достигают в точке X.

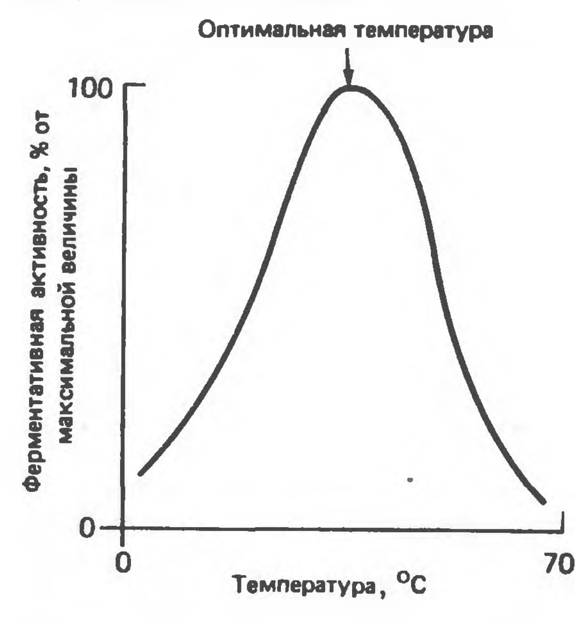


Рис. 8.12. Влияние температуры на скорость гипотетической ферментативной реакции.

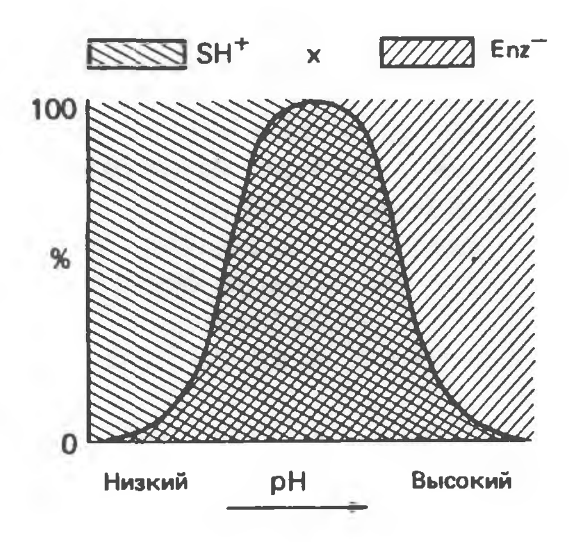


Рис. 8.13. Влияние pH на активность фермента.

При изменении pH ферменты могут претерпевать конформационные изменения. Для поддержания активной третичной или четвертичной структуры может оказаться необходимым присутствие определенного заряда на группе, удаленной от области связывания субстрата; именно такая ситуация наблюдается в случае гемоглобина (гл. 6). Если заряд этой группы изменится, могут произойти частичное развертывание белковой цепи, или, наоборот, компактизация молекулы, или же ее диссоциация на протомеры — во всех случаях с потерей активности.

КОНЦЕНТРАЦИЯ РЕАКТАНТОВ

При увеличении концентрации реактантов возрастают число молекул, обладающих достаточной для реакции энергией, и частота их столкновений. Рассмотрим реакцию между двумя разными молекулами A и B:

$$A + B \rightarrow AB.$$

Удвоение концентрации A или B приведет к увеличению вдвое скорости реакции, а удвоение концентраций одновременно A и B повысит вероятность их столкновений в четыре раза. Следовательно, скорость реакции возрастет вчетверо. **Скорость реакции пропорциональна концентрациям реагирующих молекул.** Квадратные скобки используются для указания молярных концентраций [1], символ $\propto$ означает пропорциональность. Выражение для скорости принимает вид

$$\text{Скорость реакции} \propto [\text{Реагирующие молекулы}],$$

или

$$\text{Скорость реакции} \propto [A][B].$$

[1] Строго говоря, должны использоваться не молярные концентрации, а молярные активности.

Для реакции

$$A + 2B \rightarrow AB_2$$

выражение для скорости реакции имеет вид

$$\text{Скорость реакции} \propto [A][B][B],$$

или

$$\text{Скорость реакции} \propto [A][B]^2.$$

В общем случае, когда n молекул A реагируют с m молекулами B,

$$nA + mB \rightarrow A_nB_m,$$

выражение для скорости реакции принимает вид

$$\text{Скорость реакции} \propto [A]^n[B]^m.$$

КОНСТАНТА РАВНОВЕСИЯ

Поскольку все химические реакции обратимы, для обратной реакции (по отношению к той, когда n молекул A реагируют с m молекулами B)

$$A_nB_m \rightarrow nA + mB$$

соответствующее выражение для скорости реакции будет иметь вид

$$\text{Скорость реакции} \propto [A_nB_m].$$

Обратимость обозначается двойными стрелками:

$$nA + mB \rightleftarrows A_nB_m.$$

Это выражение следует читать: n молекул A и m молекул B находятся в равновесии с A_nB_m. Знак пропорциональности $\propto$ можно заменить на знак равенства, если ввести коэффициент пропорциональности k, характерный для рассматриваемой реакции. В общем случае

$$nA + mB \rightleftarrows A_nB_m$$

выражения для скорости прямой реакции (Скорость_1) и обратной реакции (Скорость_{-1}) принимают вид

$$\text{Скорость}_1 = k_1[A]^n[B]^m,$$
$$\text{Скорость}_{-1} = k_{-1}[A_nB_m].$$

Когда скорости прямой и обратной реакций равны, говорят, что система находится **в равновесии**:

$$\text{Скорость}_1 = \text{Скорость}_{-1},$$
$$k_1[A]^n[B]^m = k_{-1}[A_nB_m].$$

Отсюда

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[A_nB_m]}{[A]^n[B]^m}.$$

Отношение k_1 к k_{-1} называется **константой равновесия** K_{eq}. Следует запомнить следующие свойства системы, находящейся в состоянии равновесия

1. Константа равновесия равна отношению **констант** скоростей прямой и обратной реакций, k_1/k_{-1}.

2. В равновесии **скорости** прямой и обратной реакций (но не их константы) равны.

3. **Равновесие является динамическим состоянием.** Хотя **суммарного** изменения концентрации реагентов и продуктов в равновесии не происходит, A и B постоянно превращаются в A_nB_m, и наоборот.

4. **Если известны равновесные концентрации A, B и A_nB_m, можно найти численное значение константы равновесия.**

Связь между константой равновесия и изменением стандартной свободной энергии (ΔG°) реакции

Константа равновесия связана с ΔG° соотношением

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}.$$

Здесь R — газовая постоянная, T — абсолютная температура. Поскольку их значения известны, **зная численное значение K_{eq}, можно найти ΔG°**. Если константа равновесия больше единицы, реакция идет самопроизвольно, т.е. в том направлении, как она написана (слева направо). Если же константа равновесия меньше единицы, то самопроизвольно идет обратная реакция. Заметим, однако, что константа равновесия указывает **направление**, в котором реакция может идти самопроизвольно, но не позволяет судить, будет ли реакция идти **быстро**. Иными словами, она ничего не говорит о **высоте энергетического барьера** реакции (ΔG_F; см. выше). Это следует из того, что K_{eq} определяет только ΔG°. **Скорости реакций зависят от высоты энергетического барьера, но не от величины ΔG°.**

Большинство факторов, влияющих на скорости ферментативных реакций, оказывают свое действие путем изменения локальных концентраций реагентов.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ФЕРМЕНТА

Во многих случаях бывает недостаточно знать, что данный фермент присутствует в системе, нужна еще информация о его *количестве*. При определенных условиях скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента (гл. 7).

Это бывает не всегда, что можно проиллюстрировать на примере прямой реакции, идущей в равновесных условиях. Даже если мы знаем, что прямая реакция действительно идет, нам будет казаться, что скорость ее равна нулю, поскольку с такой же скоростью идет и обратная реакция. Когда же ферментативная реакция только *начинается*, продукт еще практически отсутствует и обратная реакция не идет. Кроме того, на начальной стадии реакции концентрация субстрата соответствует его исходному количеству. Поэтому скорость в начале реакции, т.е. ее **начальная скорость (v), будет прямо пропорциональна концентрации фермента [Enz]** (гл. 7).

Фермент является реактантом, который соединяется с субстратом, образуя **фермент-субстратный комплекс Enz — S**, распадающийся на свободный фермент и продукт P. В простейшей форме можно записать

$$\mathrm{Enz} + \mathrm{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{Enz} + \mathrm{P}.$$

Отметим, что хотя в выражения для скоростей прямой и обратной реакций входит член [Enz]:

$$\text{Скорость}_1 = k_1[\mathrm{Enz}][\mathrm{S}],$$
$$\text{Скорость}_{-1} = k_{-1}[\mathrm{Enz}][\mathrm{P}],$$

в выражении для константы равновесия [Enz] уже не содержится:

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\mathrm{Enz}][\mathrm{P}]}{[\mathrm{Enz}][\mathrm{S}]} = \frac{[\mathrm{P}]}{[\mathrm{S}]}.$$

Таким образом, **концентрация фермента не оказывает влияния на константу равновесия. K_{eq} не зависит от того, каким образом достигается равновесие — с участием фермента или без него** (вспомним о величине ΔG°). Фермент меняет путь, по которому идет реакция, но не конечные (равновесные) концентрации реагентов и продуктов, от которых зависят K_{eq} и ΔG°.

КОНЦЕНТРАЦИЯ СУБСТРАТА

Далее мы будем рассматривать ферментативные реакции, в которых имеется единственный субстрат и единственный продукт. Такая ситуация действительно наблюдается для некоторых ферментативных реакций, однако большинство из них протекает с участием двух и более субстратов и продуктов. Это, однако, нисколько не снижает ценности дальнейших рассуждений. То, что справедливо для одного субстрата, остается верным и для двух.

При увеличении концентрации субстрата [S] и сохранении всех остальных условий **начальная скорость v** (скорость, измеряемая в период, когда израсходована очень малая доля субстрата) будет повышаться до максимальной величины V_{max}, после чего останется постоянной (рис. 8.14).

По мере повышения концентрации субстрата скорость будет расти до тех пор, пока не произойдет насыщения фермента субстратом. Измеренная в таких условиях начальная скорость уже не будет возрастать при дальнейшем повышении концентрации субстрата. Отметим, что субстрат обычно берут в значительном молярном избытке по отношению к ферменту. Например, если фермент с мол. массой 100 000 взаимодействует с субстратом с мол. массой

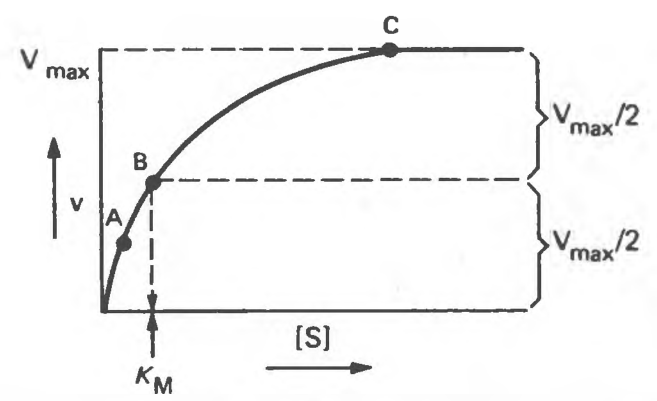


Рис. 8.14. Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции.

100 и оба присутствуют в концентрации 1 мг/мл, то на каждый моль фермента будет приходиться 1000 молей субстрата. Более реальными являются следующие величины:

$$[Enz] = 0{,}1 \text{ мкг/мл} = 10^{-9} \text{ М},$$
$$[S] = 0{,}1 \text{ мг/мл} = 10^{-3} \text{ М},$$

т. е. молярный избыток субстрата по отношению к ферменту составляет 10^6.

Даже если [S] уменьшить в 100 раз, его концентрация все еще в 10 000 раз будет превышать концентрацию фермента.

Ситуация, соответствующая точкам А, В и С на рис. 8.14, проиллюстрирована на рис. 8.15. В точках А и В в комплексе с субстратом находится лишь часть молекул фермента, хотя молекул субстрата намного больше, чем молекул фермента. Это происходит потому, что константа равновесия реакции Enz + S ⇄ Enz – S (образование комплекса Enz – S) хотя и велика, но конечна. Таким образом, **в точках А и В повышение или понижение [S] будет приводить к увеличению или уменьшению доли молекул Enz, связанных с S (т. е. доли молекул Enz – S), и *v* будет зависеть от [S].** В точке С практически все молекулы фермента связаны с субстратом, и дальнейшее повышение [S], хотя и повысит частоту столкновений Enz с S, не сможет привести к повышению скорости реакции — среди молекул фермента уже не будет таких, которые были бы свободны для реакции с субстратом.

Случай В представляет особый теоретический интерес, поскольку при этом ровно половина молекул фермента насыщена субстратом. Соответственно скорость равна **половине максимальной скорости** ($V_{max}/2$), достижимой при данной концентрации фермента.

УРАВНЕНИЕ МИХАЭЛИСА—МЕНТЕН

Графическое определение константы Михаэлиса K_M

Концентрация субстрата, при которой скорость составляет половину максимальной, обозначается через K_M и называется константой Михаэлиса. Ее можно определить из графика зависимости *v* от [S] (рис. 8.14). Обратите внимание, что K_M имеет размерность молярной концентрации.

Когда [S] приближается к K_M, *v* становится весьма чувствительной к изменению [S]; в этой области фермент работает со скоростью, равной половине максимальной. Многие ферменты характеризуются такими значениями K_M, которые примерно соответствуют физиологическим концентрациям их субстратов.

Уравнение Михаэлиса—Ментен

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

описывает поведение многих ферментов при изменении концентрации субстратов. Используя это уравнение, зависимость начальной скорости ферментативной реакции от [S] и K_M можно проиллюстрировать на следующих конкретных примерах.

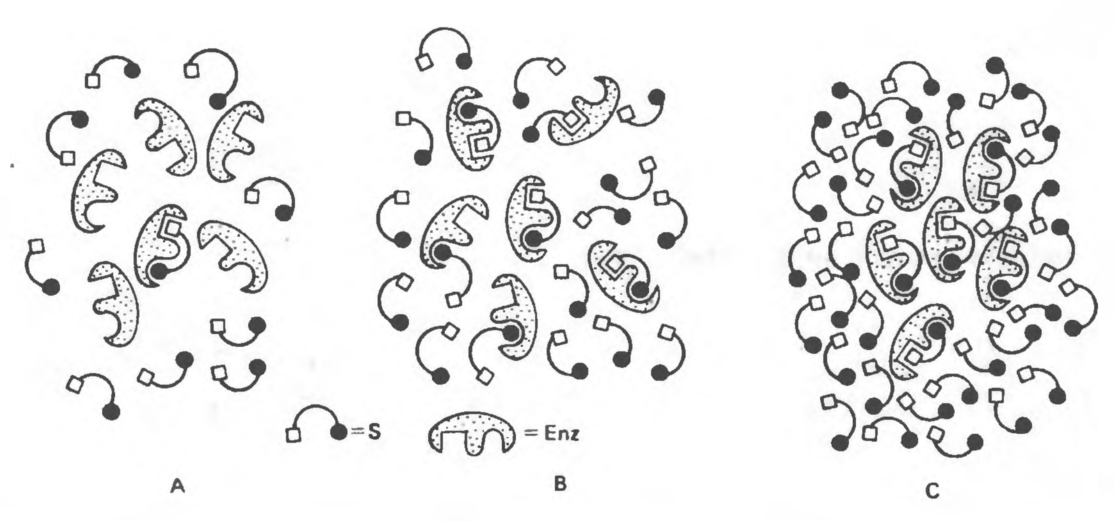


Рис. 8.15. Схема, поясняющая связывание субстрата ферментом при низкой (А) и высокой (С) концентрации субстрата, а также при концентрации субстрата, равной K_M (В). Состояния А, В и С отвечают точкам А, В, С на кривой, приведенной на рис. 8.14.

1. **[S] много меньше K_M** (точка A на рис. 8.14 и 8.15). В этом случае величину [S] в знаменателе можно опустить, и он будет практически равен K_M. Отношение двух констант, V_{max} и K_M, можно заменить новой константой K. Таким образом, имеем:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}. \qquad v \simeq \frac{V_{max}[S]}{K_M} \simeq K[S]$$

($\simeq$ означает «примерно равно»).

Другими словами, **когда концентрация субстрата значительно ниже той, при которой скорость реакции составляет половину максимальной (т. е. значительно меньше K_M), начальная скорость v пропорциональна концентрации субстрата [S].**

2. **[S] много больше K_M** (точка C на рис. 8.14 и 8.15). В этом случае член K_M в знаменателе можно опустить, т. е.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}; \qquad v \simeq \frac{V_{max}[S]}{[S]} \simeq V_{max}.$$

Это означает, что **при концентрации субстрата [S], намного превышающей K_M, начальная скорость v равна максимальной V_{max}.**

3. **[S] = K_M** (точка B на рис. 8.14 и 8.15).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}; \qquad v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}.$$

Это означает, **что при концентрации субстрата, равной K_M, начальная скорость реакции v составляет половину максимальной**. Отсюда же следует **способ оценки K_M**: надо **экспериментально определить концентрацию субстрата, при которой начальная скорость равна половине максимальной**.

Для многих ферментов определение V_{max} (а значит, и K_M) непосредственно из графика зависимости v от [S] оказывается затруднено. Для этого используют уравнение, обратное уравнению Михаэлиса—Ментен, т. е.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]},$$

и представляют его правую часть в виде суммы двух слагаемых:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}.$$

Отсюда, упростив, получаем

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}.$$

Итак, мы имеем уравнение **прямой**

$$y = ax + b,$$

где $y = 1/v$ и $x = 1/[S]$.

Если построить график зависимости y (т.е. $1/v$) от x (т.е. $1/[S]$), то длина отрезка b, отсекаемого от оси y, будет равна $1/V_{max}$, а тангенс угла наклона a—K_M/V_{max}. Длину отрезка, отсекаемого от оси x (в области отрицательных значений), можно получить, приравняв y нулю. Тогда

$$x = -\frac{b}{a} = -\frac{1}{K_M}.$$

График уравнения Михаэлиса — Ментен в обратных координатах называют **графиком Лайнуивера — Бэрка** (рис. 8.16). Используя его, K_M можно найти либо из наклона прямой и длины отрезка, отсекаемого от оси y, либо из длины отрезка, отсекаемого в области отрицательных значений от оси x. Поскольку [S] имеет размерность молярной концентрации, **K_M тоже измеряется в молях на литр**. Скорость v может быть выражена в любых единицах, поскольку **K_M не зависит от [Enz.]**. График, построенный в обратных координатах, позволяет определить K_M по относительно небольшому числу точек, именно поэтому он часто используется для нахождения K_M.

Используя график Лайнуивера — Бэрка на практике для оценки K_M, иногда сталкиваются с тем, что почти все точки оказываются в области низких концентраций субстрата. Это происходит в том случае, когда измерения проводят через равные интервалы [S]. Чтобы этого избежать, измерения следует проводить при таких значениях [S], которые соответствуют равным интервалам по шкале обратных величин.

Альтернативный подход к экспериментальной оценке K_M и V_{max} предложили Иди и Хофсти. Уравнение Михаэлиса — Ментен можно преобразовать

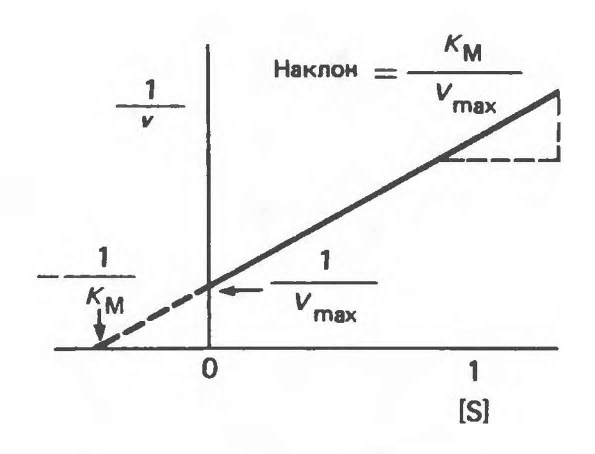


Рис. 8.16. График Лайнуивера — Бэрка в двойных обратных координатах (зависимость $1/v_x$ от $1/[S]$), используемый для графического определения K_M и V_{max}.

к виду

$$\frac{v_i}{[S]} = -v\frac{1}{K_M} + \frac{V_{max}}{K_M}.$$

Чтобы найти K_M и V_{max}, строят график зависимости $v/[S]$ (ось y) от v (ось x). Тогда длина отрезка, отсекаемого от оси y, будет равна V_{max}/K_M, а отрезка, отсекаемого от оси x,— V_{max}. Тангенс угла наклона равен — $1/K_M$.

Уравнения Лайнуивера — Бэрка и Иди — Хофсти весьма удобны в некоторых случаях, однако для строгого определения K_M и V_{max} требуется соответствующая статистическая обработка.

Оценки K_M имеют практическую ценность. При концентрациях субстрата, в 100 раз превышающих K_M, фермент будет работать практически с максимальной скоростью, поэтому **максимальная скорость** (V_{max}) будет **отражать количество присутствующего активного фермента**. Это немаловажное обстоятельство используют для оценки содержания фермента в препарате. Значение K_M позволяет ориентироваться, **какое количество субстрата следует добавить для определения** V_{max}. Графики, построенные в обратных координатах, находят широкое применение при оценке действия ингибиторов.

Соотношение между K_M и K_d — константой диссоциации фермент-субстратного комплекса

Сродство фермента к субстрату равно **величине, обратной константе диссоциации** K_d **комплекса Enz — S:**

$$Enz + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} Enz—S,$$

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}.$$

Иными словами, чем слабее выражена тенденция фермент-субстратного комплекса к диссоциации, тем выше сродство фермента к субстрату.

Мерой K_d может ориентировочно служить значение K_M для данного фермента по отношению к его субстрату. Однако это возможно только в том случае, если справедливо допущение, использовавшееся при выводе уравнения Михаэлиса — Ментен. Оно состояло в том, что первая стадия ферментативной реакции

$$Enz + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} Enz—S$$

идет быстро и при этом всегда на этой стадии поддерживается равновесие. Другими словами, скорость диссоциации Enz — S на Enz + S намного выше, чем скорость диссоциации на фермент + продукт:

$$Enz—S \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} Enz + P.$$

Из уравнения Михаэлиса — Ментен следует, что величина [S], при которой $v = \frac{V_{max}}{2}$, равна

$$[S] = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_M.$$

Но если

$$k_{-1} \gg k_2,$$

то

$$k_2 + k_{-1} \simeq k_{-1}$$

и

$$[S] = \frac{k_{-1}}{k_1} \simeq K_d.$$

При этих условиях $1/K_M = 1/K_d$ и равно **сродству** фермента к субстрату. Если $k_2 + k_{-1} \not\simeq k_{-1}$, то $1/K_M$ даст заниженную оценку сродства.

ОГРАНИЧЕНИЯ, ПРИСУЩИЕ УРАВНЕНИЮ МИХАЭЛИСА — МЕНТЕН

Некоторые ферменты и другие лигандсвязывающие белки, например гемоглобин (см. гл. 6 и 10), не подчиняются классической кинетике насыщения Михаэлиса — Ментен. График зависимости v от [S] носит в этом случае сигмоидный характер (рис. 8.17). Это обычно указывает на кооперативное связывание субстрата многими центрами — связывание с одним центром влияет на связывание с другим, как это происходит с гемоглобином (гл. 6).

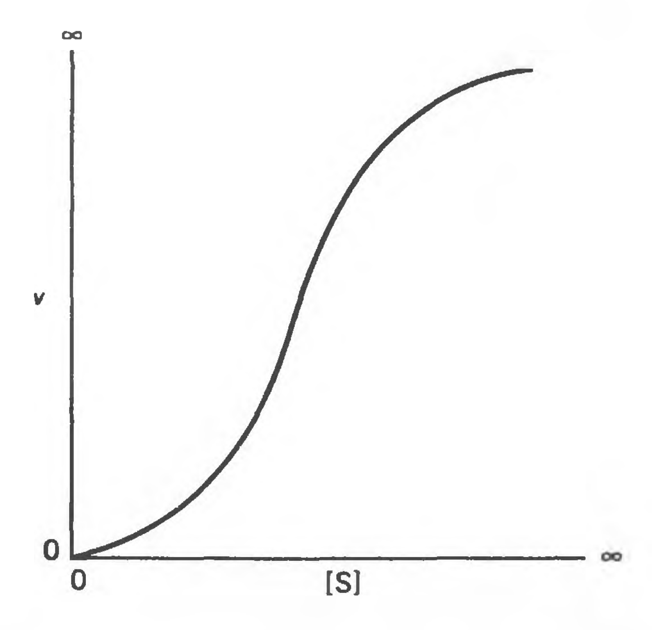


Рис. 8.17. Сигмоидная кинетическая кривая с насыщением.

В таком случае описанный выше метод графической оценки концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, оказывается непригодным (прямой в соответствующих координатах уже не получается). Здесь следует обратиться к графическому представлению уравнения Хилла, первоначально предложенного для описания кооперативного связывания O_2 с гемоглобином (гл. 6). Уравнение Хилла, преобразованное так, чтобы график в соответствующих координатах представлял собой прямую, имеет вид

$$\log \frac{v}{V_{max} - v} = n \log [S] - \log k',$$

где k' — константа. Из уравнения следует, что в условиях, когда [S] мало по сравнению с k', скорость реакции возрастает как n-я степень [S]. На рис. 8.18 приведен график Хилла, построенный по кинетическим данным для фермента, характеризующегося кооперативным связыванием субстрата. График зависимости $\log (v/V_{max} - v)$ от log [S] представляет собой прямую с тангенсом угла наклона, равным n, где n — эмпирический параметр, зависящий от числа субстратсвязывающих центров и характера взаимодействия между ними. При $n = 1$ связывающие центры не зависят друг от друга. При $n > 1$ между центрами имеется кооперативное взаимодействие; чем больше n, тем выше степень кооперативности и тем более выражена сигмоидность кривых насыщения. При $n < 1$ говорят об отрицательной кооперативности.

Когда скорость реакции равна половине максимальной ($v = V_{max}/2$), $v/(V_{max} - v) = 1$ и $\log [v/(V_{max} - v)] = 0$. Таким образом, чтобы определить величину S_{50} (концентрацию субстрата, при которой скорость вдвое меньше максимальной), нужно из точки на прямой, для которой $\log [v/(V_{max} - v)] = 0$, опустить перпендикуляр на ось x.

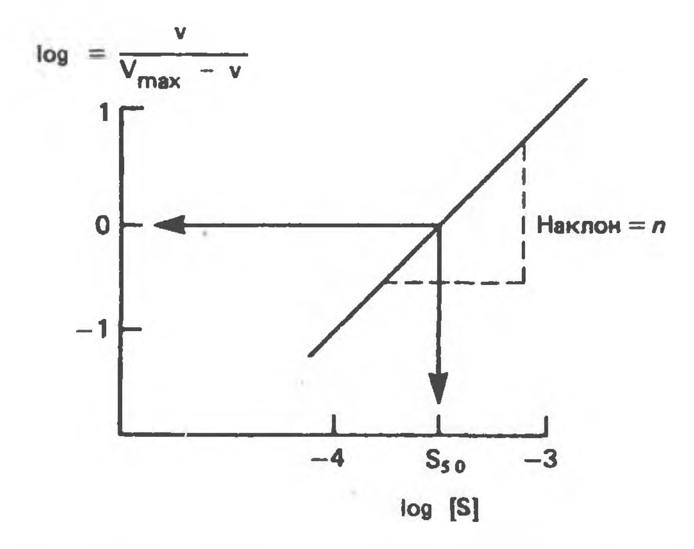


Рис. 8.18. Графический способ определения из уравнения Хилла концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, в условиях, когда кинетическая кривая носит сигмоидный характер.

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Различают два больших класса ингибиторов ферментативной активности — конкурентные и неконкурентные — на основании того, ослабляется (конкурентное ингибирование) или не ослабляется (неконкурентное ингибирование) их ингибирующее действие при повышении концентрации субстрата. На практике многие ингибиторы не проявляют тех свойств, которые характерны для чисто конкурентного или чисто неконкурентного ингибирования. Другой способ классификации ингибиторов основывается на характере места их связывания. Одни из них связываются с ферментом в том же месте, что и субстрат (в каталитическом центре), а другие — на значительном расстоянии от активного центра (в аллостерическом центре).

Конкурентное ингибирование аналогами субстрата

Классическое конкуретное ингибирование основано на связывании ингибитора с субстратсвязывающим (каталитическим) центром. Химическая структура аналога субстрата, действующего как ингибитор (I), обычно сходна со структурой субстрата (S). Поэтому ингибитор может обратимо связываться с ферментом, образуя вместо Enz—S комплекс Enz—I, т. е. фермент-ингибиторный комплекс. Когда в реакционной смеси одновременно присутствуют и субстрат, и ингибитор указанного типа, они конкурируют за один и тот же связывающий центр на поверхности фермента. Один из наиболее подробно изученных примеров конкурентного ингибирования — это ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом (I), конкурирующим за один и тот же центр с субстратом сукцинатом (S).

Сукцинатдегидрогеназа катализирует образование фумарата в результате отщепления атома водорода от каждого из двух α-углеродных атомов сукцината (рис. 8.19). Малонат ($^-OOC—CH_2—COO^-$) способен связываться с дегидрогеназой, образуя комплекс Enz—I. От C_α-атома малоната отщепления атома водорода произойти не может. Комплекс Enz—I может только распадаться на свободный фермент и ингибитор. Для этой обратимой реакции

$$\text{Enz—I} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \text{Enz} + \text{I}$$

константа равновесия K_i равна

$$K_i = \frac{[\text{Enz}][\text{I}]}{[\text{Enz—I}]} = \frac{k_1}{k_{-1}}.$$

$$\begin{array}{c} H \\ | \\ H-C-COO^- \\ | \\ ^-OOC-C-H \\ | \\ H \end{array} \xrightarrow[\text{Сукцинатдегидрогеназа}]{-2H} \begin{array}{c} H-C-COO^- \\ \| \\ ^-OOC-C-H \end{array}$$

Сукцинат Фумарат

Рис. 8.19. Сукцинатдегидрогеназная реакция.

Действие конкурентных ингибиторов можно представить в виде следующих реакций:

$$Enz \underset{\pm I}{\rightleftarrows} EnzI \text{ (неактивн.)} \nrightarrow Enz + P$$
$$Enz \underset{\pm S}{\rightleftarrows} EnzS \text{(активн.)} \rightarrow Enz + P$$

Скорость образования продукта — обычно именно она является объектом измерения — зависит только от концентрации комплекса Enz — S. Предположим, что I очень прочно связывается с ферментом (K_i мала). Тогда количество свободного фермента (Enz), который мог бы присоединять S, образуя комплекс Enz — S, а затем и Enz + P, будет весьма мало. Таким образом, скорость реакции (образования P) будет мала. По аналогичным причинам при той же концентрации слабо связывающегося ингибитора (K_i велика) катализируемая реакция существенно не замедлится. Предположим теперь, что при фиксированной концентрации ингибитора I добавляется все большее количество субстрата S. Это повышает вероятность образования комплекса Enz — S по сравнению с комплексом Enz — I. С ростом отношения [Enz — S]/[Enz — I] будет расти и скорость реакции. При достаточно высокой концентрации S концентрация комплекса Enz — I станет исчезающе мала. Но тогда скорость катализируемой реакции будет такой же, что и в отсутствие I (рис. 8.20).

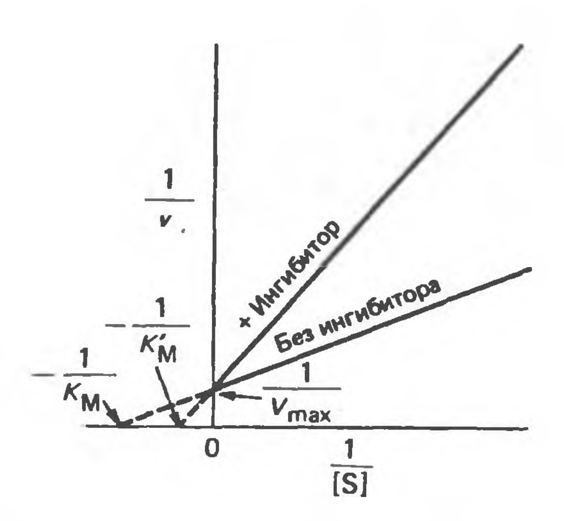


Рис. 8.20. График Лайнуивера — Бэрка для случая классического конкурентного ингибирования. Обратите внимание на полное отсутствие ингибирующего действия при высоких значениях [S] (низких значениях (1/[S]).

Графическая оценка констант конкурентного ингибирования

На рис. 8.20 приведен типичный случай конкурентного ингибирования, представленный в форме графика Лайнуивера — Бэрка. Скорость реакции (v) измеряется при разных значениях концентрации S и при фиксированной концентрации ингибитора. Прямые, проведенные через экспериментальные точки, пересекаются в одной и той же точке на оси y. Длина отрезка, отсекаемого от оси y, равна $1/V_{max}$; это означает, что **при бесконечно большой концентрации S (1/[S] = 0) v будет такой же, что и в отсутствие ингибитора**. Однако длина отрезка, отсекаемого от оси x (а эта величина определяет значение K_M), в присутствии ингибитора уменьшается ($-1/K'_M < -1/K_M$). Таким образом, **конкурентный ингибитор повышает кажущееся значение K_M (K'_M)** для субстрата. Для простого конкурентного ингибирования длина отрезка, отсекаемого от оси x, будет равна

$$x = \frac{1}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}.$$

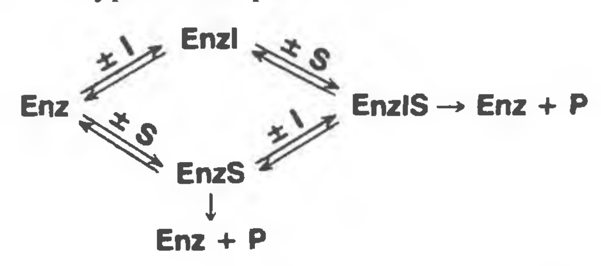
Определив K_M в отсутствие I, можно найти из этого уравнения K_i. Если концентрация добавленного I значительно превышает концентрацию фермента, то можно считать [I] равной концентрации добавленного ингибитора. Значения K_i для ряда аналогов субстрата (конкурентных ингибиторов) показывают, какой из них наиболее эффективен. Ингибиторы с наименьшими K_i даже при малых концентрациях могут оказывать сильное ингибирующее действие.

Многие лекарственные препараты, широко применяющиеся в клинике, действуют как конкурентные ингибиторы очень важных ферментов, функционирующих как в микробных, так и в животных клетках.

Обратимое неконкурентное ингибирование

Как следует уже из самого названия, в этом случае конкуренция между S и I отсутствует. При этом ингибитор обычно ничем не напоминает S и, как можно предположить, связывается с другим участком фермента. **Обратимые неконкурентные ингибиторы понижают максимальную скорость, достижимую при данном количестве фермента (понижают V_{max}), но, как правило, не влияют на K_M.** Поскольку I и S связываются с разными центрами, возможно образование как комплекса Enz — I, так и комплекса Enz — IS. Комплекс Enz — IS тоже распадается с образованием продукта, однако с меньшей скоростью, чем Enz — S; поэтому реакция будет замедляться, но не остановится. Таким образом, могут протекать сле-

дующие конкурентные реакции:



На рис. 8.21 представлена зависимость $1/v$ от $1/[S]$ в присутствии и в отсутствие ингибитора (предполагается, что связывание I не приводит к существенным изменениям в работе активного центра).

Необратимое неконкурентное ингибирование

Ферментативная активность может уменьшаться в присутствии многих «ядов», таких, как иодацетамид, ионы тяжелых металлов (Ag^{+}, Hg^{2+}), окисляющие агенты и т. д. В присутствии одного или нескольких субстратов или продуктов скорость инактивации фермента может снижаться. Тот кинетический анализ, о котором здесь шла речь, может оказаться недостаточным для того, чтобы отличить действие ферментных ядов от действия неконкурентных обратимых ингибиторов. Обратимое неконкурентное ингибирование встречается сравнительно редко. К сожалению, оно не всегда выявляется, поскольку и обратимое, и необратимое неконкурентное ингибирование характеризуются сходной кинетикой.

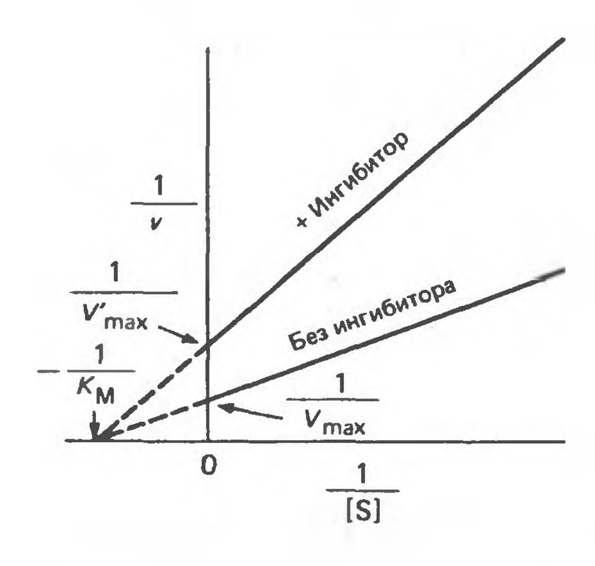


Рис. 8.21. График Лайнуивера — Бэрка для случая обратимого неконкурентного ингибирования.

МОДУЛЯТОРЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Поток энергии и вещества (в виде атомов углерода) в ходе метаболизма зависит от процессов синтеза ферментов и активации проферментов. Однако процессы эти необратимы. Как и все белки млекопитающих, ферменты распадаются на аминокислоты (обновление белков). В бактериальных клетках активность фермента может «разбавляться» из-за распределения его среди дочерних клеток, образующихся в результате последовательных делений. Хотя оба механизма приводят к уменьшению концентрации фермента и как следствие к уменьшению каталитической активности, идут такие процессы медленно и сопровождаются большими затратами вещества: представим себе по аналогии, что мы выключали бы свет, разбивая лампочку, а затем, чтобы снова его включить, вкручивали бы новую лампочку. Ясно, что гораздо эффективнее регулировать активность фермента, «включая» и «выключая» его. **Каталитическая активность** некоторых ключевых ферментов действительно регулируется с помощью низкомолекулярных метаболитов (см. гл. 6). Низкомолекулярные **модуляторы**, подавляющие ферментативную активность, называют **отрицательными модуляторами**, а повышающие ее — **положительными**. Мы рассмотрим их в гл. 10 и в последующих главах.

ЛИТЕРАТУРА

Christensen H. N. Dissociation, Enzyme Kinetics, Bioenergetics, Saunders, 1975.
Engle P. C. Enzyme Kinetics, Wiley, 1977.
Piszkiwicz D. Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions, Oxford Univ. Press, 1977.
Segel I. H. Enzyme Kinetics, Wiley, 1975.
Sigman D. S., Mooser G. Chemical studies of enzyme active sites, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 889.
Van Tamlen E. E. (ed.) Bioorganic Chemistry, Vol. 1, Enzyme Action, 1977; Vol. 2, Macro- and Multimolecular Systems, 1977; Vol. 3, Substrate Behavior, 1978, Academic Press.

Глава 9

Ферменты: механизм действия

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

В этой главе мы детально опишем каталитическое действие протеолитического фермента химотрипсина, чтобы проиллюстрировать принципы катализа, общие для всех ферментов.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Чем обусловлены столь высокая каталитическая эффективность ферментов и их специфичность? Это одна из фундаментальных научных проблем, хотя некоторые ее аспекты имеют и прикладное значение. Переход неактивных проферментов в каталитически активное состояние, который наблюдается в клетках при определенных патологических условиях (например, при остром панкреатите), приводит к внутриклеточному перевариванию и разрушению тканей. Проводя фундаментальные иследования механизма действия ферментов, мы в конце концов сможем, используя технологию рекомбинантных ДНК и метод направленного точечного мутагенеза, систематически синтезировать ферменты с более высокой каталитической активностью или новой специфичностью. Некоторые из этих «синтетических» ферментов могут оказаться мощными терапевтическими агентами. Если мы хотим понять, как действуют металлы на биологические системы, мы тоже должны исследовать их влияние на работу ферментов.

МЕХАНИЗМ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМОТРИПСИНА

Природа и специфичность полной реакции

Химотрипсин катализирует гидролиз пептидных связей, в которых карбоксильная группа принадлежит ароматической аминокислоте (Phe, Tyr или Trp) или аминокислоте с объемной неполярной R-группой (Met).

Как и многие другие протеазы, химотрипсин катализирует также гидролиз некоторых сложных эфиров. Эта его способность не имеет физиологического значения, но она успешно используется в экспериментах, направленных на детальное изучение механизма катализа.

n-Нитрофенилацетат, полезный синтетический субстрат

Использование синтетического субстрата *n*-нитрофенилацетата (рис. 9.1) позволяет определять активность химотрипсина колориметрическими методами, поскольку гидролиз *n*-нитрофенилацетата приводит к образованию *n*-нитрофенола, который в щелочной среде превращается в имеющий желтую окраску *n*-нитрофенолят-анион.

Изучение кинетики методом остановленной струи

Кинетику гидролиза *n*-нитрофенилацетата химотрипсином можно изучать с помощью так называемого метода остановленной струи. Метод состоит в смешивании примерно эквимолярных количеств фермента и субстрата и немедленном (в течение несколько миллисекунд) измерении. Растворы реагентов заливают в два шприца и с помощью механического устройства одновременно и практически мгновенно выталкивают их в очень узкую трубку, проходящую через спектрофотометр. На экран осциллографа выводятся данные об оптической плотности как функции времени, прошедшего с момента смешивания.

Рис. 9.1. *n*-Нитрофенилацетат.

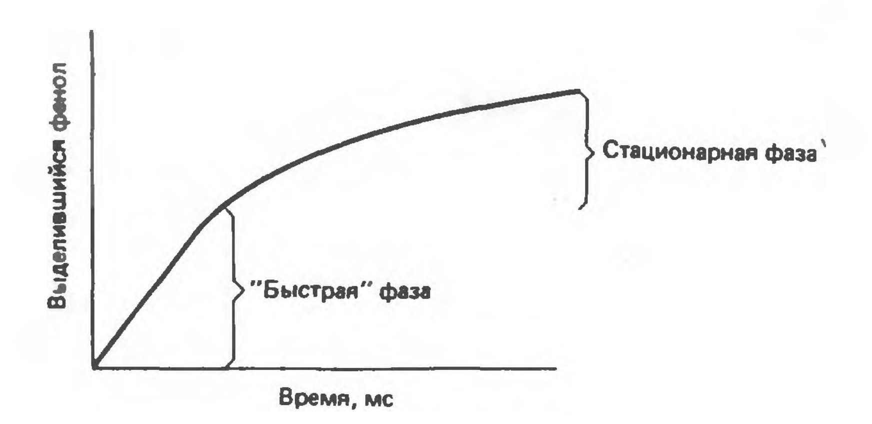


Рис. 9.2. Кинетика освобождения *п*-нитрофенолят-аниона в ходе гидролиза *п*-нитрофенилацетата химотрипсином, регистрируемая методом остановленной струи. Количество выделившегося *п*-нитрофенола определяется путем измерения оптической плотности.

Двухфазный характер гидролиза *п*-нитрофенилацетата

Кинетическая кривая образования *п*-нитрофенолят-аниона имеет две четко различающиеся фазы (рис. 9.2): 1) фаза «выброса», характеризующаяся быстрым образованием *п*-нитрофенолят-аниона, 2) последующее медленное образование еше некоторого количества *п*-нитрофенолят-аниона.

Образование и распад фермент-субстратного комплекса

Двухфазный характер образования *п*-нитрофенолят-аниона можно объяснить, рассматривая последовательные стадии катализа, приведенные на рис. 9.3.

Медленная стадия представляет собой гидролиз химотрипсин-ацетатного комплекса (ХТ-Ац). После того как весь имеющийся химотрипсин перейдет в состав комплекса, выделение *п*-нитрофенолят-аниона замедлится из-за отсутствия свободного фермента, который освобождается лишь по мере медленного отщепления от комплекса ацетат-иона (рис. 9.3). Фаза «выброса» *п*-нитрофенолят-аниона (рис. 9.2) соответствует переходу всего имеющегося химотрипсина в состав комплекса ХТ-Ац с одновременным образованием *п*-нитрофенолят-аниона. Освобождение этого продукта сразу вслед за быстрой фазой обусловлено медленным высвобождением химотрипсина в процессе гидролиза комплекса ХТ-Ац. Этот свободный химотрипсин снова включается в реакцию образования комплексов ХТ-ПНФ и ХТ-Ац, сопровождающуюся выделением *п*-нитрофенолят-аниона. Количество выделившегося *п*-нитрофенолят-аниона прямо пропорционально числу молей химотрипсина, присутствующего в смеси.

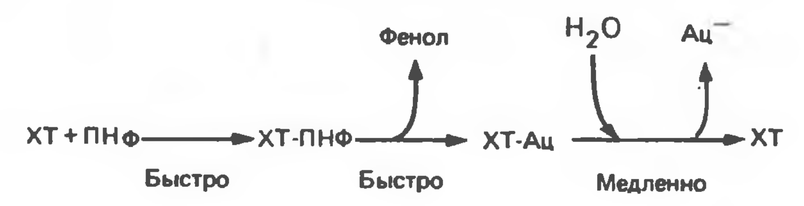


Рис. 9.3. Промежуточные стадии катализируемого химотрипсином гидролиза *п*-нитрофенилацетата. ХТ — химотрипсин; ПНФ — *п*-нитрофенилацетат; ХТ-ПНФ — комплекс химотрипсина с *п*-нитрофенилацетатом; ХТ-Ац — ацетилхимотрипсин; фенол — *п*-нитрофенолят-анион; Ац⁻ — ацетат-анион. Образование комплекса ХТ-ПНФ и ацетилфермента ХТ-Ац идет намного быстрее гидролиза ХТ-Ац.

Enz—CH_2OH + F—P(=O)(O—)(O—) —(HF)→ Enz—CH_2—O—P(=O)(O—)(O—)

ДИФФ

Рис. 9.4. Реакция гидроксила Ser 195 в составе химотрипсина с диизопропилфторфосфатом (ДИФФ).

Роль Ser 195 в катализе

Ацильная группа, входящая в состав интермедиата ацил-ХТ, связана с высокореакционноспособным остатком серина — Ser 195. Особая роль и высокая реакционная способность Ser 195 проявляется в способности этого остатка (отсутствующей у остальных 27 сериновых остатков химотрипсина) вступать в реакцию с диизопропилфторфосфатом (ДИФФ) (рис. 9.4). Аналогичные реакции характерны и для других сериновых протеаз.

При модификациии Ser 195 химотрипсин инактивируется. По аналогичному механизму в присутствии ДИФФ происходит инактивация и ряда других протеаз. Все они называются сериновыми протеазами.

Система переноса заряда

В ходе катализа в молекуле химотрипсина функционирует система переноса заряда, которая служит каналом переноса протона. Эта система включает три аминокислотных остатка, далеко отстоящих друг от друга в первичной структуре, но сближенных в рамках третичной структуры до расстояний, допускающих возможность взаимодействия. Этими остатками являются Asp 102, His 57 и Ser 195. Хотя в химотрипсине большинство заряженных остатков находится на поверхности молекулы, остатки, из которых формируется система переноса заряда, укрыты во внутренней неполярной части молекулы. Три упомянутых остатка образуют цепочку Asp 102 ... His 57 .... Ser 195.

Рис. 9.5. Функционирование системы переноса протонов в химотрипсине при ацилировании остатка Ser 195 субстратом (Суб$^-$).

Напомним, что Ser 195 — это тот самый остаток, который в ходе катализа подвергается ацилированию. Сближение ацетат-аниона (образующегося из *n*-нитрофенилацетата) с атомом кислорода R-группы Ser 195 приводит к последовательному переносу протона от Ser 195 к His 57 и далее к Asp 102 (рис. 9.5).

В ходе деацилирования комплекса ацил-Ser 195 протон перемещается в обратном направлении. Аналогичный перенос протона, как полагают, происходит и при гидролизе физиологических субстратов химотрипсина — пептидов.

РОЛЬ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ПРОТЕОЛИЗА В ФОРМИРОВАНИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ФЕРМЕНТОВ

Превращение прохимотрипсина в химотрипсин

Прохимотрипсин — это полипептид, состоящий из 245 аминокислотных остатков. Его превращение в активный фермент, α-химотрипсин, начинается с протеолитического разрыва, приводящего к образованию каталитически активного π-химотрипсина (π-ХТ), который далее протеолитически расщепляется еще в трех местах (рис. 9.6).

В α-химотрипсине цепи А, В и С (рис. 9.6) остаются связанными друг с другом двумя межцепочечными дисульфидными связями (рис. 9.7).

Проферменты

Многие белки синтезируются и секретируются в форме неактивных белков-предшественников, которые называют **пробелками**. В тех случаях, когда белки являются ферментами, пробелки называют **проферментами** или **зимогенами**. Превращение пробелка в зрелый белок осуществляется путем избирательного протеолиза. В пробелке происходит один или несколько последовательных протеолитических разрывов, после чего появляется характерная для зрелого белка активность (например, ферментативная). К числу белков, синтезируемых в виде пробелков, относятся гормон инсулин (его пробелком является проинсулин), пищеварительные ферменты пепсин, трипсин и химотрипсин (пробелки — пепсиноген, трипсиноген и химотрипсиноген), несколько факторов каскадных систем свертывания крови и растворения кровяного сгустка (см. гл. 55), белок соединительной ткани коллаген (пробелок — проколлаген).

Почему некоторые белки секретируются в неактивной форме? Дело в том, что есть два типа белков. Одни из них необходимы практически постоянно, надобность же в других (например, ферментах, участвующих в образовании и растворении кровяного сгустка) возникает лишь эпизодически. Однако когда в этих, в норме отсутствующих, ферментах возникает реальная потребность, они оказываются необходимыми немедленно. Некоторые физиологические процессы, например пищеварение, тоже не идут непрерывно, но они более или менее регулярны и предсказуемы (правда, у первобытного человека это могло быть и не так). В других случаях (например, при образовании кровяного сгустка, при его растворении или при восстановлении поврежденной ткани) физиологические процессы являются непосредственной реакцией на внезапно возникшие физиологические потребности организма или патологические состояния. Понятно, что процессы образования кро-

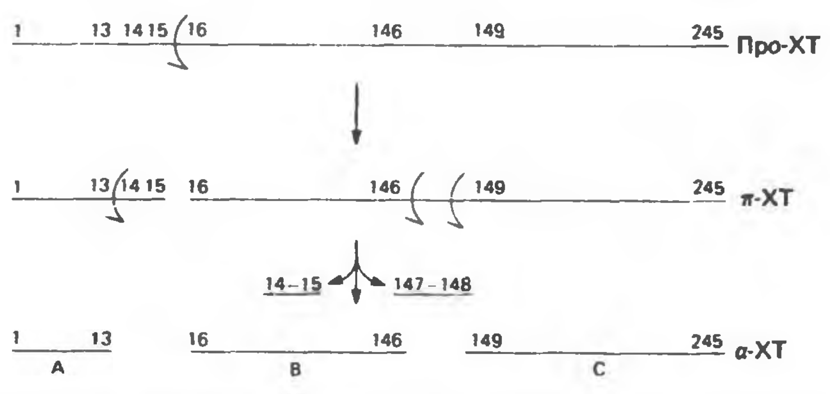


Рис. 9.6. Схема превращения прохимотрипсина (про-ХТ) в π-химотрипсин (π-ХТ) и далее в зрелый, каталитически активный α-химотрипсин (α-ХТ).

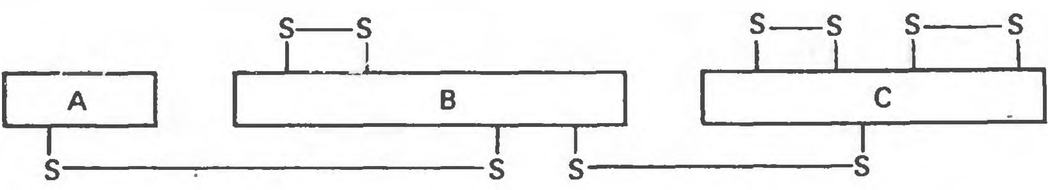


Рис. 9.7. Схема внутри- и межцепочечных дисульфидных связей в α-химотрипсине (α-ХТ).

вяного сгустка и его растворения должны быть скоординированы, чтобы был достигнут гемостаз. Наконец, следует указать, что синтез протеаз в виде каталитически неактивных предшественников защищает ткани, в которых они синтезируются (например, ткань поджелудочной железы), от самопереваривания (такое самопереваривание наблюдается при панкреатите).

Синтез новых белков, потребность в которых обусловливается патологическими факторами (например, потерей крови), может осуществляться довольно быстро. Однако для этого необходимо, чтобы имелся соответствующий и достаточно полный пул аминокислот; кроме того, процесс секреции может оказаться слишком медленным, чтобы удовлетворить внезапно возникшую физиологическую потребность в том или ином белке.

Рассмотрим общие принципы превращения пробелка в зрелую, физиологически активную форму.

1. Процесс включает избирательный протеолиз, в некоторых случаях он сводится к осуществлению единственного протеолитического разрыва.

2. Полипептидные продукты могут далее функционировать как индивидуальные молекулы или же могут оставаться ассоциированными друг с другом в зрелой форме белка.

3. Процесс может (но необязательно) сопровождаться значительными изменениями молекулярной массы.

4. Главным следствием избирательного протеолиза является изменение конформации молекулы.

5. Если пробелок превращается в фермент, то указанные выше конформационные изменения играют важную роль в формировании каталитического центра фермента. В этом смысле избирательный протеолиз профермента можно рассматривать как процесс запуска конформационных изменений, обеспечивающих формирование каталитического центра.

Обратите внимание, что остатки His 57 и Asp 102 находятся в составе B-пептида α-химотрипсина, тогда как Ser 195 — в C-пептиде (рис. 9.6). Таким образом, избирательный протеолиз прохимотрипсина (химотрипсиногена) обеспечивает сближение трех остатков, участвующих в переносе заряда. Этот пример наглядно показывает, как с помощью избирательного протеолиза может формироваться каталитический центр. Следует еще отметить, что каталитические остатки и остатки субстратсвязывающего центра, попадая в разные полипептидные цепи, тем не менее оказываются на таких расстояниях друг от друга, при которых они могут взаимодействовать с субстратом.

УПОРЯДОЧЕННОЕ И НЕУПОРЯДОЧЕННОЕ СВЯЗЫВАНИЕ СУБСТРАТОВ

Многие ферменты катализируют реакцию между двумя и более субстратами, в результате которой образуется один или несколько продуктов. Для протекания одних ферментативных реакций необходимо одновременное присутствие всех субстратов. В других случаях фермент сначала взаимодействует с одним субстратом, а затем катализирует его реакцию с другим субстратом. Связывание субстратов может происходить **неупорядоченным** или **упорядоченным** образом (рис. 9.8).

Многие ферментативные реакции, требующие обязательного присутствия коферментов, протекают по «челночному» механизму, при котором фермент попеременно находится в состояниях E и E′ (рис. 9.9 и 9.10).

Хотя кофермент часто может рассматриваться как второй субстрат, некоторые коферменты ковалентно связываются с ферментом или связываются нековалентно, но настолько прочно, что диссоциации практически не наблюдается (тиаминпирофосфат). В этих случаях мы считаем, что ферментом служит весь фермент-коферментный комплекс.

ФЕРМЕНТЫ КАК КАТАЛИЗАТОРЫ ОБЩЕГО КИСЛОТНОГО И ОБЩЕГО ОСНОВНОГО ТИПА

После связывания субстрата в области каталитического центра заряженные (или способные нести заряд) функциональные группы боковых цепей могут

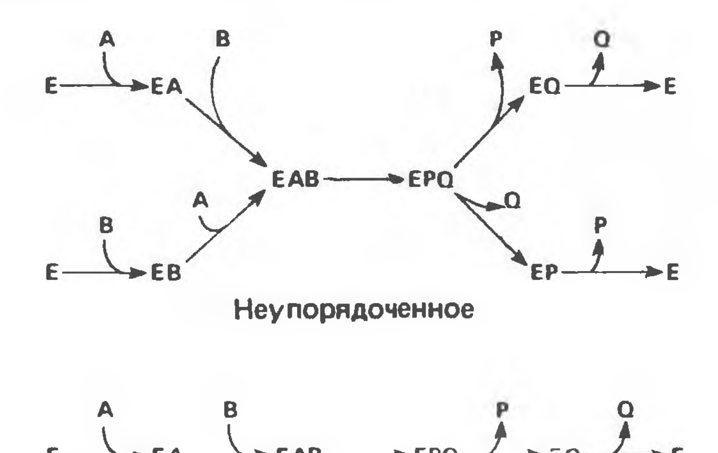


Рис. 9.8. Неупорядоченное и упорядоченное присоединение субстратов A и B к ферменту и высвобождение продуктов P и Q из комплекса с ферментом E.

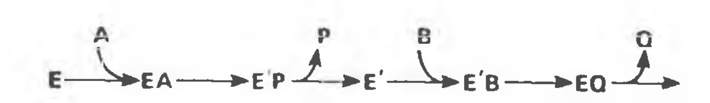


Рис. 9.9. Схема механизма «пинг-понг» ферментативного катализа.

E—CHO —(Ala)→ E(CHO)(Ala) ——→ E(CH_2NH_2)(Pyr) ——→(Pyr) E—CH_2NH_2 —(KG)→ E(CH_2NH_2)(KG) ——→ E(CHO)(Glu) ——→(Glu) E—CHO

Рис. 9.10. Механизм «пинг-понг» при переаминировании. E—CHO и E—CH_2NH_2 — комплексы фермента с пиридоксальфосфатом и пиридоксаминфосфатом соответственно. (Ala — аланин, Pyr — пируват, KG — α-кетоглутарат, Glu — глутамат.)

участвовать в катализе в качестве кислотных или оснóвных катализаторов.

Мы различаем две широкие категории ферментативного кислотно-оснóвного катализа: **общий** кислотный (или оснóвный) и **специфический** кислотный (или оснóвный).

Реакции, скорость которых изменяется при изменении концентрации ионов H^+ или H_3O^+, но не зависит от концентрации других кислот или оснований, присутствующих в растворе, рассматриваются как реакции, осуществляемые в результате **специфического кислотного** или **специфического оснóвного катализа**. Реакции, скорость которых зависит от присутствия в растворе любых кислот (доноров протонов) и любых оснований (акцепторов протонов), рассматриваются как реакции, осуществляемые в результате **общего кислотного** или **общего оснóвного катализа**.

Для того чтобы решить, какой именно катализ имеет место в данной ферментативной реакции — общий или специфический кислотный или основный,— нужно измерить скорость реакции в следующих условиях: 1) при различных pH, но при постоянной концентрации буфера; 2) при фиксированном pH, но при различных концентрациях буфера.

Если скорость реакции при постоянной концентрации буфера изменяется с изменением pH, то имеет место **специфический оснóвный катализ** (при pH > 7) или **специфический кислотный катализ** (при pH < 7). Если же скорость реакции при фиксированном pH возрастает с повышением концентрации буфера, то осуществляется **общий основный катализ** (при pH > 7) или **общий кислотный катализ** (при pH < 7).

В качестве примера специфического кислотного катализа рассмотрим превращение субстрата S в продукт P. Реакция протекает в две стадии: за быстрой стадией, включающей обратимый перенос протона:

$$S + H_3O^+ \rightleftarrows SH^+ + H_2O,$$

следует более медленная, лимитирующая скорость всего процесса стадия превращения протонированного субстрата в продукт:

$$SH^+ + H_2O \rightleftarrows P + H_3O^+.$$

Повышая концентрацию ионов гидрония $[H_3O^+]$, мы повышаем концентрацию SH^+ — сопряженной кислотной формы субстрата; поскольку SH^+ является субстратом лимитирующей стадии, возрастет и скорость полной реакции. Математически это можно записать следующим образом:

$$\text{Скорость реакции} = \frac{d[P]}{dt} = k[SH^+],$$

где P — продукт, t — время, k — удельная константа скорости, $[SH^+]$ — концентрация сопряженной кислотной формы субстрата.

Поскольку концентрация SH^+ зависит одновременно от концентраций S и H_3O^+, общее выражение для скорости реакции, катализируемой по типу специфического кислотного катализа, примет вид

$$\frac{d[P]}{dt} = k'[S][H_3O^+].$$

Обратите внимание на свойственную специфическому кислотному катализу особенность: в выражение для скорости реакции входят только члены [S] и $[H_3O^+]$.

Рассмотрим теперь в дополнение к описанному выше специфическому кислотному катализу также и катализ, осуществляемый ионом имидазолия имидазольного буфера. Поскольку имидазол — это слабая кислота ($pK_a \simeq 7$), он является плохим донором протонов; поэтому реакция

$$S + \text{Имидазол } H^+ \rightarrow SH^+ + \text{Имидазол}$$

протекает медленно и лимитирует скорость полной реакции. Отметим, что быстрая и медленная стадии в случаях специфического и общего кислотного катализа меняются местами. Выражение для скорости реакции в случае общего кислотного катализа часто имеет довольно сложный вид и поэтому здесь не рассматривается.

ИОНЫ МЕТАЛЛОВ

Свыше 25% всех ферментов содержат прочно связанные ионы металлов или активны только в их присутствии. Для изучения функций ионов металлов используются методы рентгеновской кристаллографии, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В сочетании со сведениями об образовании и распаде ме-

таллсодержащих комплексов и о реакциях, в которых затрагивается координационная сфера ионов металлов, данные, полученные этими методами, позволяют лучше понять роль ионов металлов в ферментативном катализе. Об этой роли и говорится ниже.

Металлоферменты и ферменты, активируемые металлами

Металлоферменты содержат определенное количество ионов металлов, имеющих функциональное значение и остающихся связанными с молекулой фермента в ходе его очистки. Ферменты, активируемые металлами, связывают последние менее прочно, но для своей активности требуют добавления металлов в среду. Таким образом, разграничение между металлоферментами и ферментами, активируемыми металлами, основано на сродстве данного фермента к иону «своего» металла. Механизмы, основанные на участии ионов металлов в катализе, в обоих случаях, по-видимому, сходны.

Тройные комплексы фермент — металл — субстрат

Для тройных (трехкомпонентных) комплексов, включающих каталитический центр (Enz), ион металла (M) и субстрат (S) со стехиометрией 1:1:1, возможны четыре различных схемы образования:

Enz — S — M	**M — Enz — S**
Комплекс с мостиковым субстратом	Комплекс с мостиковым ферментом
Enz — M — S	**Enz** (циклическая схема: Enz связан с M и S, M — S)
Простой комплекс с мостиковым металлом	Циклический комплекс с мостиковым металлом

В случае ферментов, активируемых металлами, реализуются все четыре схемы. Для металлоферментов образование комплекса Enz — S — M невозможно, иначе они не могли бы удерживать металл в процессе очистки (они находятся в форме Enz — — M). Можно сформулировать три общих правила.

1. Большинство (но не все) киназ (ATP:фосфотрансферазы) образуют комплексы с мостиковым субстратом типа Enz — нуклеозид — M.

2. Фосфотрансферазы, использующие в качестве субстрата пируват или фосфоенолпируват, другие ферменты, катализирующие реакции с участием фосфоенолпирувата, а также карбоксилазы образуют комплексы с мостиковым металлом.

3. Данный фермент может быть способен к образованию мостикового комплекса одного типа с одним субстратом и другого типа — с другим.

Комплексы с мостиковым ферментом (M — Enz — S)

Металлы в комплексах с мостиковым ферментом, по-видимому, выполняют структурную роль, поддерживая активную конформацию (примером служит глутаминсинтаза), или образуют мостик с другим субстратом (как в пируваткиназе). В пируваткиназе ион металла играет не только структурную роль, но и удерживает один из субстратов (ATP) и активирует его:

Пируваткиназа — ATP (M связан с Пируваткиназой и ATP) — Креатин.

Комплексы с мостиковым субстратом

Образование тройных комплексов с мостиковым субстратом, которое наблюдается при взаимодействии ферментов с нуклеозидтрифосфатами, по-видимому, связано с вытеснением H_2O из координационной сферы металла, место которой занимает ATP:

$$ATP^{4-} + M(H_2O)^{2+}_6 \rightleftarrows ATP—M(H_2O)^{2}_{3} + 3H_2O.$$

Затем субстрат связывается с ферментом, образуя тройной комплекс:

$$ATP—M(H_2O)^{2-}_3 + Enz \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows Enz—ATP—M(H_2O)^{2-}_3.$$

В фосфотрансферазных реакциях ионы металлов, как полагают, активируют атомы фосфора и образуют жесткий полифосфат-адениновый комплекс в соответствующей конформации, который включается в состав активного четырехкомпонентного комплекса.

Комплексы с мостиковым металлом

Enz–M–S или Enz (циклическая схема: Enz связан с M и S, M — S)

Кристаллографические данные, а также анализ первичной структуры показывают, что в активных центрах многих белков в связывании металла участвует остаток гистидина (примерами служат карбоксипептидаза A, цитохром *c*, рубредоксин, метмиоглобин и метгемоглобин; см. гл. 6). Лимитирующей стадией образования бинарных (двухкомпонентных) комплексов Enz — M во многих случаях является вытеснение воды из координационной сферы иона металла. Активация многих пептидаз ионами металла является медленным процессом, длящимся несколько часов. Эта медленная реакция,

по всей вероятности, состоит в конформационной перестройке бинарного комплекса Enz—M, приводящей к формированию активной конформации. Этот процесс можно представить таким образом:

Связывание металла·

$$\mathrm{Enz} + \mathrm{M(H_2O)_6} \xrightarrow{\text{Быстрая стадия}} \mathrm{Enz{-}M(H_2O)_{6-n}} + n\mathrm{H_2O}$$

Перестройка с образованием активной конформации (Enz*):

$$\mathrm{Enz{-}M(H_2O)_{6-n}} \xrightarrow{\text{Медленная стадия}} \mathrm{Enz^*{-}M(H_2O)_{6-n}}\,.$$

В случае металлоферментов образование тройного комплекса с мостиковым металлом должно происходить путем присоединения субстрата к бинарному комплексу:

$$\mathrm{Enz{-}M} + \mathrm{S} \rightleftharpoons \mathrm{Enz{-}M{-}S} \text{ или } \mathrm{Enz}\begin{smallmatrix}\diagup \mathrm{M} \\ | \\ \diagdown \mathrm{S}\end{smallmatrix}$$

Роль металлов в катализе

Ионы металлов могут участвовать в каждом из четырех известных типов механизмов, с помощью которых ферменты ускоряют химические реакции: 1) общий кислотно-основный катализ; 2) ковалентный катализ; 3) сближение реактантов; 4) индукция напряжения в ферменте или субстрате. Помимо ионов железа, которые функционируют в гемсодержащих белках, в ферментативном катализе чаще всего участвуют Mg^{2+}, Mn^{2+} и Ca^{2+}, хотя в работе некоторых ферментов важную роль играют и другие ионы (например, K^{+}).

Ионы металлов, как и протоны, являются льюисовыми кислотами (электрофилами) и могут образовывать со своими лигандами δ-связь за счет поделенной электронной пары. Ионы металлов можно рассматривать также как «сверхкислоты», поскольку они устойчивы в нейтральном растворе, часто несут положительный заряд (> 1) и способны к образованию π-связей. Кроме того (в отличие от протонов), металлы могут служить трехмерной матрицей, ориентирующей основные группы фермента или субстрата.

Ионы металлов могут функционировать как акцепторы электронов с образованием δ- или π-связей, активируя электрофилы или нуклеофилы (общий кислотно-основный катализ). Металлы могут активировать нуклеофилы, отдавая электроны, или же сами действовать как нуклеофилы. Координационная сфера металла может обеспечивать контактирование фермента и субстрата (сближение) либо путем образования хелатов переводить фермент или субстрат в напряженное состояние. Ион металла может маскировать нуклеофил, предотвращая побочные реакции. Наконец, возможен стереохимический контроль хода ферментативной реакции, который обеспечивается способностью координационной сферы металла играть роль трехмерной матрицы, удерживающей реагирующие группы в нужной пространственной ориентации (табл. 9.1).

Таблица 9.1. Примеры, иллюстрирующие роль ионов металлов в механиме действия ферментов[1]

Фермент	Роль иона металла
Гистидиндезаминаза	Маскирование нуклеофила
Киназы, лиазы, пируватдекарбоксилаза	Активация электрофила
Карбоангидраза	Активация нуклеофила
Кобамидные ферменты	Металл действует как нуклеофил
Пируваткарбоксилаза, карбоксипептидаза, алкогольдегидрогеназа	Удаление π-электронов
Негемовые железопротеины	Металл служит донором π-электронов
Пируваткиназа, пируваткарбоксилаза, аденилаткиназа	Ион металла связывает лиганды и ориентирует их друг относительно друга
Фосфотрансфераза, D-ксилозоизомераза, гемопротеины	Индукция напряженного состояния

[1] Из работы Mildvan A. S.: Metals in enzyme catalysis. Vol. 2, p. 456 in: *Enzymes*, Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (editors). Academic Press. 1970, с изменениями.

ЛИТЕРАТУРА

Crane F. Hydroquinone dehydrogenases, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 439.

Fersht A. Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed., Freeman, 1985. [Имеется перевод 1-го издания: Фёршт Э. Структура и механизм действия ферментов.— М.: Мир, 1980.]

Kraut J. Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 331.

Mildvan A. S. Mechanism of enzyme action, Annu. Rev. Biochem., 1974, **43**, 357.

Purich D. L. (ed.) Enzyme kinetics and mechanisms. Parts A and B. In: Methods in Enzymology, Vol. 63, 1979; Vol. 64, 1980, Academic Press.

Wimmer M. J., Rose I. A. Mechanisms of enzyme-catalyzed group transfer reactions, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 1031.

Wood H. G., Barden R. E. Biotin enzymes, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 385.

Глава 10

Ферменты: регуляция активности

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

В этой главе мы рассмотрим на нескольких примерах механизмы регуляции метаболических процессов, в которых участвуют ферменты. При этом мы постараемся обрисовать общую картину регуляции. В дальнейшем в этой книге мы не раз встретимся и со многими другими примерами, иллюстрирующими многообразие процессов регуляции метаболизма.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Механизмы, посредством которых клетки и целые организмы координируют и регулируют весь набор метаболических процессов, представляют интерес для ученых, работающих в самых разных областях биомедицинских наук. Сюда можно отнести проблемы канцерогенеза, сердечно-сосудистых заболеваний, старения, физиологии микроорганизмов, дифференцировки, метаморфоза, действия гормонов и лекарственных препаратов. Во всех этих областях наблюдаются примеры нарушений регуляции работы ферментов, имеющие важное медицинское значение. Например, изучение экспериментальных опухолей показывает, что во многих раковых клетках наблюдаются нарушения регуляции, приводящие к изменению пропорций при образовании ферментов (отсутствие их индукции или репрессии). Это подтверждает хорошо известное положение, согласно которому одним из фундаментальных признаков раковых клеток является нарушение системы генетического контроля. Или другой пример: некоторые онкогенные вирусы содержат ген, кодирующий тирозиновую протеинкиназу; когда эта киназа экспрессируется в клетках хозяина, она фосфорилирует многие белки и ферменты, которые в норме не фосфорилированы, что приводит к серьезным изменениям клеточного фенотипа. Изменения подобного характера, по-видимому, лежат в основе целой категории клеточных трансформаций, вызываемых онкогенными вирусами. И наконец, последняя из упомянутых выше областей биомедицины, связанная с действием лекарств: здесь мы тоже обнаруживаем множество примеров, свидетельствующих о важности процессов регуляции работы ферментов. В частности, известно, что введение некоторых лекарств приводит к усилению синтеза ряда ферментов (эти лекарства действуют как индукторы ферментов). Например, фенобарбитал приводит к значительному (в 3—5 раз) увеличению содержания микросомного фермента цитохрома *P*-450, который играет центральную роль в метаболизме самого фенобарбитала и многих других лекарственных препаратов. Один из таких препаратов — варфарин, препятствующий свертыванию крови. Если больной принимает варфарин, а затем ему назначают фенобарбитал, то доза варфарина должна быть существенно увеличена, чтобы компенсировать его разрушение под действием индуцированного цитохрома *P*-450. Индукция ферментов — это один из важных биохимических механизмов взаимообусловленного действия лекарств, когда прием одного препарата сопровождается значительным изменением в метаболизме другого.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

Гомеостаз

Представление о гомеостатической регуляции внутренней среды было введено Клодом Бернаром в конце XIX в. Эта способность животного поддерживать постоянным состав внутриклеточной среды означает, что все необходимые ферментативные реакции протекают со скоростями, соответствующими изменениям внутренней среды организма и его окружения. Клетку или организм можно считать **больными**, если они неадекватно реагируют на внутреннее или внешнее воздействие. Чтобы понять механизмы гомеостаза нормальных клеток и выяснить молекулярные основы различных заболеваний, важно представить, от каких факторов зависят скорости ферментативных реакций.

Все химические реакции, в том числе и ферментативные, до некоторой степени обратимы [1]. Однако внутри живых клеток такой обратимости может и не быть, поскольку продукты реакции быстро удаляются в результате других ферментативных реакций. Поток метаболитов в живых клетках можно уподобить течению воды по водопроводной трубе. Хотя вода может течь по трубе в обе стороны, на практике она течет всегда в одном направлении. Поток метаболитов в клетках тоже в основном является однонаправленным. Истинное равновесие, совершенно нехарактерное для живых существ, устанавливается лишь после гибели клеток. Живая клетка — это динамическая стационарная система, в которой поддерживается однонаправленный поток метаболитов (рис. 10.1). В зрелых клетках средние концентрации метаболитов в течение длительного периода времени остаются примерно постоянными [2]. Гибкость стационарной системы обеспечивается всевозможными подстроечными и компенсационными процессами, с помощью которых организм поддерживает постоянство внутренней среды, несмотря на разнообразие диеты, различия в количестве потребляемой жидкости и поступающих минеральных веществ, объеме выполняемой работы и температуре окружающей среды.

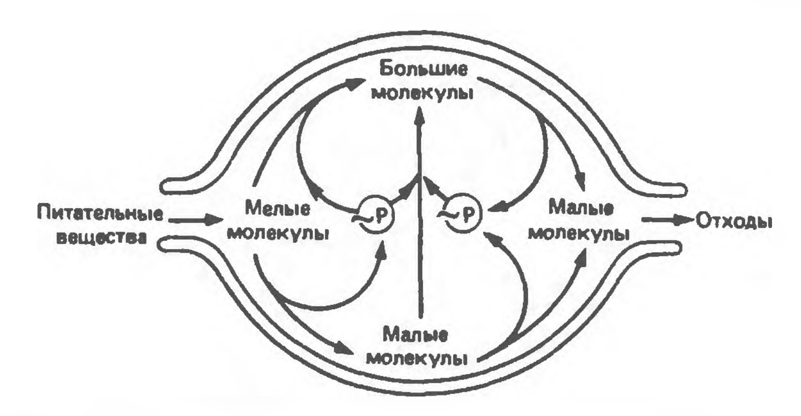


Рис. 10.1. Схематическое представление клетки в стационарном состоянии.

Общая картина регуляции метаболизма

Для нормального функционирования организма должна осуществляться точная регуляция потока метаболитов по анаболическим и катаболическим путям. Все сопутствующие химические процессы должны протекать со скоростями, отвечающими требованиям организма как целого в условиях окружающей среды. Генерация ATP, синтез макромолекул, транспорт, секреция, реабсорбция в почечных канальцах должны чутко реагировать на самые небольшие изменения в окружении, в котором находится клетка, орган, животное. Эти процессы должны быть скоординированы и отвечать на изменения во внешней среде (например, на поступление питательных веществ или их удаление), а также на периодически происходящие внутриклеточные события (например, репликацию ДНК). До недавнего времени детали регуляции на молекулярном уровне изучались только на бактериях; у этих организмов отсутствуют сложные системы гормонального и нервного контроля и молекулярные процессы можно исследовать генетическими методами. Однако сейчас мы имеем возможность всесторонне изучать механизмы регуляции на молекулярном уровне и в животных клетках.

Для изучения заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма, и для разработки методов их лечения совершенно необходимо иметь представление о регуляторных процессах, осуществляющихся в клетках человека. В то же время регуляция на молекулярном уровне многих метаболических процессов у млекопитающих изучена недостаточно. Ясно, что регуляция метаболизма у млекопитающих существенно отличается от внешне сходных процессов у бактерий. Тем не менее мы все же рассмотрим эти вопросы именно для бактерий, поскольку это позволит нам охарактеризовать общие принципы регуляции, которые сохраняют свое значение и при изучении процессов регуляции у человека.

Способы регуляции работы ферментов

Поток углерода, «проходящий» через ту или иную ферментативную реакцию, можно регулировать, изменяя следующие параметры: 1) абсолютное количество присутствующего фермента; 2) пул реагентов (помимо фермента); 3) каталитическую эффективность фермента. Большинство форм жизни использует все три типа регуляции.

РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА ФЕРМЕНТА ПУТЕМ РЕГУЛЯЦИИ СКОРОСТИ ЕГО СИНТЕЗА И РАСПАДА

Общие принципы

Абсолютное количество фермента в клетке определяется скоростями его синтеза ($k_{синт}$) и распада ($k_{расп}$) (рис. 10.2). Соответственно количество фермента увеличивается либо в результате повышения скорости его синтеза (увеличением $k_{синт}$), либо снижения скорости распада (уменьшением $k_{расп}$), либо обоими способами сразу. Подобным же образом ко-

[1] Легко обратимая реакция характеризуется малым по абсолютной величине ΔG. Реакции с большим отрицательным ΔG для большинства биохимических систем могут считаться практически необратимыми.

[2] При этом, однако, наблюдаются кратковременные колебания концентраций метаболитов и содержания ферментов, которые имеют важное физиологическое значение.



Рис. 10.2. Количество фермента определяется балансом процессов его синтеза и распада.

личество фермента уменьшается в результате либо уменьшения $k_{синт}$, либо увеличения $k_{расп}$, либо и тем и другим путем. В клетках человека может происходить изменение и $k_{синт}$, и $k_{расп}$. У всех живых организмов синтез ферментов (и всех других белков) из аминокислот и распад фермента (белка) на аминокислоты представляют собой разные процессы, которые катализируются совершенно разными наборами ферментов. В этих условиях легко осуществляется независимая регуляция скорости синтеза фермента и скорости его распада.

Синтез ферментов детерминируется информацией, содержащейся в ДНК

Первичная структура фермента, как и любого другого белка, определяется той информацией, которая записана в информационной (матричной) РНК (мРНК) и считывается с помощью трехбуквенного (триплетного) кода. Нуклеотидная последовательность мРНК в свою очередь определяется комплементарной последовательностью оснований ДНК-матрицы, т.е. соответствующего гена (см. гл. 38 и 40).

В результате **мутаций** нуклеотидная последовательность ДНК может измениться, и будут синтезироваться белки с измененной первичной структурой. Если новая аминокислота сильно отличается по своим свойствам от исходной, изменения могут охватить высокие уровни структурной организации и может произойти частичная или полная утрата каталитической активности (впрочем, в редких случаях наблюдается, напротив, ее повышение). Мутации в различных генетических локусах могут приводить к нарушению синтеза самых разных ферментов и тем самым к развитию многих генетических заболеваний.

Индукция ферментов

Клетки могут синтезировать специфические ферменты в ответ на присутствие специфических низкомолекулярных индукторов. Индукцию ферментов можно проиллюстрировать на следующем примере. Клетки *Escherichia coli*, выращенные на глюкозе, не способны сбраживать лактозу из-за отсутствия фермента β-галактозидазы, гидролизующей лактозу, которая распадается на глюкозу и галактозу. Если в питательную среду добавить лактозу или некоторые другие β-галактозиды, то индуцируется синтез β-галактозидазы, и культура клеток обретает способность сбраживать лактозу.

Индуктор (лактоза) является субстратом индуцируемого белка (β-галактозидазы). Многие индукторы одновременно служат субстратами ферментов, которые они индуцируют, однако в роли индукторов могут выступать и соединения, структурно сходные с субстратом, но сами не являющиеся субстратами. И наоборот, соединение может быть субстратом, но не являться индуктором. Нередко какое-либо соединение индуцирует сразу несколько ферментов данного катаболического пути. В этих случаях говорят, что структурные гены, кодирующие группу катаболических ферментов, составляют **оперон**, и все ферменты, кодируемые генами оперона, индуцируются единственным индуктором (**координированная индукция**). Способность регулировать синтез ферментов с помощью того или иного питательного вещества позволяет бактерии использовать это питательное вещество с максимальным для себя преимуществом; в то же время «ненужные» ферменты бактерия не синтезирует.

Ферменты, концентрация которых в клетке не зависит от добавления индукторов, называются **конститутивными**. Данный фермент может быть конститутивным для одного штамма, индуцируемым для другого и вообще отсутствовать в третьем. Обычно клетки содержат небольшое, но измеримое количество соответствующего фермента даже в отсутствие индуктора. Это — **базовый уровень**. Величина отклика данного организма на введение индуктора определяется генетически (см. гл. 41). При индукции различных штаммов может наблюдаться повышение содержания фермента, варьирующее от двукратного до тысячекратного. Таким образом, содержащаяся в клетке наследственная генетическая информация определяет и характер, и величину реакции на введение индуктора. Следовательно, понятия «конститутивный» и «индуцируемый» относительны: они характеризуют лишь крайние точки всего спектра возможных реакций.

Индукция ферментов наблюдается и у эукариот. Примерами индуцируемых ферментов у млекопитающих являются триптофанпирролаза, треониндегидраза, тирозин-α-оксоглутарат—трансаминаза, инвертаза, ферменты цикла мочевины, HMG-СоА-редуктаза и цитохром *P*-450.

Репрессия и дерепрессия ферментов

Бактерии, способные синтезировать определенный метаболит, при наличии этого метаболита в среде могут приостановить его синтез в результате **репрессии**. В этом случае небольшая молекула, на-

пример пурин или аминокислота, действуя как **корепрессор**, блокирует синтез ферментов, участвующих в биосинтезе самого корепрессора. Например, добавление гистидина в среду, на которой растет бактерия *Salmonella typhimurium*, подавляет (репрессирует) синтез всех ферментов биосинтеза гистидина; добавление в среду лейцина репрессирует синтез первых трех ферментов, которые участвуют исключительно в биосинтезе лейцина. В обоих случаях гены ферментов, ответственных за биосинтез данного метаболита, образуют **оперон**: добавление в среду конечного продукта биосинтеза, гистидина или лейцина, вызывает **координированную репрессию**. Координированная репрессия наблюдается не для всех путей биосинтеза. После удаления из среды корепрессора или же при истощении его запасов биосинтез соответствующих ферментов возобновляется. Это явление называют **дерепрессией**. Дерепрессия может быть координированной и некоординированной.

Приведенные выше примеры иллюстрируют **репрессию конечным продуктом по принципу обратной связи**, характерную для процессов биосинтеза в бактериях. Сходное явление — **катаболитная репрессия** — состоит в том, что одно из промежуточных соединений в цепочке **катаболических** ферментативных реакций репрессирует синтез катаболических ферментов. Оно было впервые обнаружено при изучении культуры *E. coli*, растущей на среде, которая содержит в качестве источника углерода не глюкозу, а другое соединение (X). Добавление глюкозы репрессировало синтез ферментов, участвующих в катаболизме X. Это явление вначале называли «эффект глюкозы», но потом обнаружилось, что сходные эффекты могут вызывать и другие окисляемые питательные вещества; поэтому был предложен термин «катаболитная репрессия». Катаболитная репрессия осуществляется при участии cAMP. Молекулярные механизмы индукции, репрессии и дерепрессии осуждаются в гл. 41.

В разветвленных процессах биосинтеза, например при биосинтезе аминокислот с разветвленными боковыми цепями или аминокислот семейства аспартата, ферменты начальных стадий участвуют в биосинтезе нескольких аминокислот (рис. 10.3). Если в среду, на которой растут бактерии, добавить лизин, репрессируется синтез ферментов, участвующих исключительно в биосинтезе лизина (Enz_L). Добавление в среду треонина вызывает репрессию ферментов, участвующих только в биосинтезе треонина (Enz_T). Это — примеры простой репрессии конечным продуктом. В то же время ферменты Enz_1 и Enz_2 (рис. 10.3) участвуют одновременно в биосинтезе и лизина, и треонина. Если бы репрессию их синтеза вызывал каждый из конечных продуктов по отдельности, то наблюдался бы недостаток другой аминокислоты. Если же в среду добавить одновременно и лизин, и треонин, то ферменты Enz_1 и Enz_2 окажутся излишними; их репрессия была бы выгодна бактерии, поскольку позволила бы более эффективно использовать имеющиеся питательные вещества.

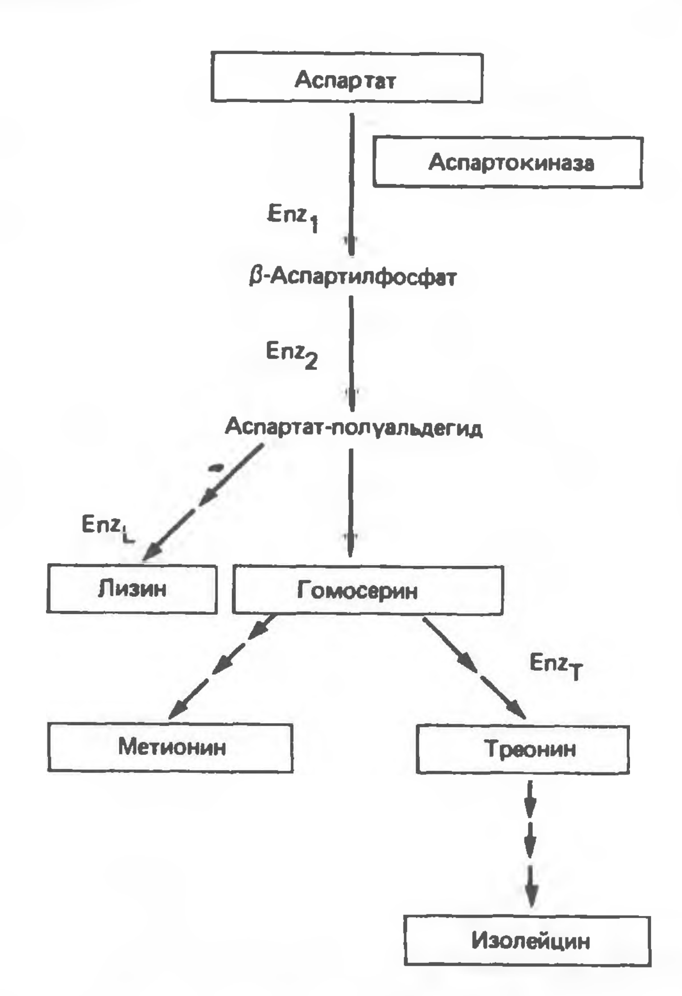


Рис. 10.3. Синтез аминокислот семейства аспартата. Под Enz_L и Enz_T подразумеваются группы ферментов, участвующих в биосинтезе лизина и треонина соответственно. Число стрелок соответствует числу стадий.

В присутствии всех конечных продуктов, образующихся на различных ответвлениях пути биосинтеза, может наблюдаться **мультивалентная репрессия**. Это происходит только тогда, когда все конечные продукты, синтезируемые данным набором ферментов, присутствуют в избытке. Следовательно, для полной репрессии аспартокиназы (Enz_1) необходимо присутствие не только лизина и треонина, но также еще и метионина, и изолейцина.

Обновление ферментов

В быстро растущих бактериях общая скорость распада белков составляет около 2% в час. Иное положение складывается, когда бактерии находятся в условиях голодания или их переносят на свежую среду, бедную углеродом. В этих условиях распад бактериальных белков идет со скоростью 7—10% в час.

Сочетание процессов синтеза и распада ферментов называют **обновлением ферментов**. Обновление происходит и у бактерий, и у млекопитающих, однако значение распада ферментов как средства регуляции их количества у бактерий недооценивалось.

В клетках млекопитающих обновление белков было обнаружено гораздо раньше, чем у бактерий. Указания на этот процесс у человека были получены более ста лет назад на основании наблюдений за людьми, получавшими специальную диету. Однако лишь после классических работ Шёнхеймера, начатых незадолго до второй мировой войны, было твердо установлено, что обновление клеточных белков происходит на протяжении всей жизни. Измеряя скорость включения в данный белок ^{15}N-меченных аминокислот и скорость утраты метки белком, Шёнхеймер пришел к выводу, что белки в организме человека находятся в состоянии «динамического равновесия»; это представление позднее было распространено на другие компоненты организма, включая липиды и нуклеиновые кислоты.

Регуляция синтеза и распада ферментов

Основные этапы синтеза белков достаточно хорошо изучены, чего нельзя сказать о процессах распада ферментов. Распад ферментов происходит в результате их гидролиза протеолитическими ферментами, но о механизме регуляции этой протеолитической активности мало что известно. Установлено только, что процессы регуляции могут быть сопряжены с расходованием ATP. Чувствительность фермента к протеолизу зависит от его конформации. Присутствие или отсутствие субстратов, коферментов, ионов металлов — все это способно влиять на конформацию белка и его чувствительность к протеолизу. Поэтому скорость распада специфических ферментов может зависеть от концентрации в клетке субстратов, коферментов и, возможно, ионов. Эти представления можно хорошо проиллюстрировать на примере аргиназы и триптофаноксигеназы (триптофанпирролазы). Регуляция содержания аргиназы в печени может осуществляться путем изменения либо $k_{синт}$, либо $k_{расп}$. Переход на обогащенную белковую диету приводит к возрастанию содержания аргиназы из-за повышения скорости ее синтеза. Содержание фермента в печени возрастает также у голодающих животных. Но это обусловлено снижением скорости распада аргиназы, поскольку значение $k_{синт}$ остается постоянным. Теперь о ситуации, которая наблюдается со вторым ферментом: инъекция млекопитающим глюкокортикоидов, как и инъекция триптофана, повышает содержание триптофаноксигеназы. Гормон вызывает повышение скорости синтеза фермента $k_{синт}$, тогда как Trp не оказывает влияния на $k_{синт}$, а понижает $k_{расп}$, повышая устойчивость оксигеназы к протеолизу. Сравним оба этих примера с индукцией ферментов у бактерий. В случае аргиназы повышенное потребление азота при нахождении на обогащенной белковой диете может увеличить содержание аргиназы (см. гл. 30). Повышение скорости синтеза аргиназы внешне напоминает индукцию субстратом, наблюдающуюся у бактерий. Для триптофанпирролазы ситуация иная: в бактериальных клетках Trp может действовать как индуктор (увеличивая $k_{синт}$), но в тканях млекопитающих он действует только на процесс распада фермента (уменьшает $k_{расп}$).

Содержание ферментов в тканях млекопитающих может изменяться в результате действия различных физиологических и гормональных факторов, а также под влиянием диеты. Известно много примеров такого рода для разных тканей и различных метаболических путей (табл. 10.1), однако наши знания о молекулярном механизме процессов носят фрагментарный характер.

Глюкокортикоиды повышают концентрацию тирозин-трансаминазы, увеличивая $k_{синт}$. На этом примере была впервые четко показана гормональная регуляция синтеза фермента в тканях млекопитающих. Инсулин и глюкагон, несмотря на взаимный антагонизм их физиологического действия, оба независимо повышают $k_{синт}$ в 4—5 раз. Действие глюкагона, вероятно, опосредуется cAMP, который оказывает аналогичное гормону действие в органной культуре печени крысы.

Превращение проферментов в активные ферменты

Ферментативная активность может регулироваться путем превращения неактивного профермента в каталитически активную форму. Чтобы перейти в такую форму, профермент должен подвергнуться ограниченному протеолизу, сопровождающемуся конформационными изменениями; при этом происходит либо демаскирование каталитического центра, либо его формирование (см. гл. 8). Синтез в форме каталитически неактивных проферментов является характерным свойством пищеварительных ферментов, а также ферментов системы свертывания крови и системы фибринолиза (см. гл. 55).

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Определения

Если в результате физиологических процессов изменяется активность фермента, то мы часто не можем сказать, чем это обусловлено — изменением количества фермента или эффективности его функционирования. **Мы будем называть все изменения активности фермента, происходящие при постоянном количестве присутствующего фермента, изменением его каталитической эффективности.**

Таблица 10.1. Некоторые ферменты печени крысы, скорость синтеза которых изменяется в зависимости от условий среды[1]

Фермент	Время полуобновления, $t_{1/2}$, ч	Внешний стимул	Относительное изменение скорости синтеза
Метаболизм аминокислот			
Аргиназа	100—120	Голодание, глюкокортикоиды	+2
		Переход от обогащенной к бедной белком диете	−2
Сериндегидратаза	20	Глюкагон, аминокислоты	+100
Гистидаза	60	Переход от бедной к обогащенной белком диете	+20
Углеводный обмен			
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	15	Гормоны щитовидной железы; переход от бедной диеты к диете с высоким содержанием углеводов	+10
D-Глицерофосфатдегидрогеназа	100	Гормоны щитовидной железы	+10
Фруктозо-1,6-фосфатаза		Глюкоза	+10
Липидный обмен			
Цитратлиаза		Переход от голодания к диете с высоким содержанием углеводов и низким содержанием жиров	+30
Синтаза жирных кислот		Голодание	−10
		Переход от голодания к диете, не содержащей жиров	+30
HMG-CoA-редуктаза	2—3	Постная диета, 5% холестерола в пище	−10
		Суточные вариации	±5
		Инсулин, гормон щитовидной железы	от 2 до 10
Метаболизм пуринов и пиримидинов			
Ксантиноксидаза		Переход к богатой белками диете	−10
Аспартат-транскарбамоилаза	60	1%-ная оротовая кислота	+2
Дигидрооротаза	12	1%-ная оротовая кислота	+3

[1] Все данные, за исключением данных по HMG-CoA-редуктазе, взяты из работы Annu. Rev. Biochem. 1970: 39: 929.

Концентрации реактантов

Изучение кинетических и регуляторных свойств ферментов позволяет лучше понять характер физиологических процессов, протекающих в неповрежденных клетках, в тканях и целом организме. Однако большая часть информации получена при изучении ферментов in vitro, в условиях, существенно отличающихся от тех, которые имеют место в живых клетках. Поэтому распространение полученных данных на условия in vivo требует осторожности. Например, концентрации субстратов in vitro могут значительно отличаться от тех, которые имеются in vivo.

Компартментация ферментов

Роль компартментации (пространственного разделения) метаболических процессов в клетках эукариот, в том числе в клетках млекопитающих, трудно переоценить. Локализация специфических метаболических процессов в цитозоле или в клеточных органеллах облегчает независимую регуляцию этих процессов. Развитая компартментация метаболических процессов особенно характерна для высших форм живых организмов — она позволяет осуществлять наиболее тонкую регуляцию метаболизма. Одновременно при этом возникает новая проблема — прохождение метаболитов через разделяющие барьеры. Эта проблема решается с помощью «челночных механизмов», переводящих метаболит в форму, которая способна проходить через барьер. Затем по другую сторону барьера происходит обратное превращение метаболита в первоначальную форму. В связи с наличием барьеров возникает потребность в функционировании, например, цитозольной и митохондриальной форм некоторых ферментов. Поскольку эти формы фермента физически разделены, их независимая регуляция облегчается. Роль челночных механизмов в поддержании равновесия между метаболическими пулами восстановительных эквивалентов промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты и ряда других интермедиатов обсуждается в гл. 17.

Макромолекулярные комплексы

Объединение набора ферментов, катализирующих многоступенчатую последовательность метаболических реакций, в макромолекулярный комплекс позволяет координировать работу ферментов и канализирует перемещения интермедиатов по метабо-

лическому пути. Адекватное взаимное расположение ферментов облегчает перенос продукта от одного фермента к другому без его предварительного уравновешивания с метаболическим пулом. Это обеспечивает более эффективный метаболический контроль, чем в том случае, когда компоненты комплекса изолированы друг от друга. Кроме того, конформационные изменения в одном из компонентов могут передаваться через межбелковые взаимодействия на другие компоненты комплекса. Это позволяет усиливать регуляторные эффекты.

Эффективные концентрации субстратов, коферментов и катионов

Средние внутриклеточные концентрации субстрата, кофермента или ионов металлов мало что могут сказать нам о поведении фермента in vivo. Необходимо иметь информацию о концентрациях соответствующих метаболитов **в непосредственном окружении рассматриваемого фермента**. Однако даже измерение концентрации метаболита в отдельных компартментах клетки не позволяет учесть локальные перепады его концентрации внутри компартмента, обусловленные, например, приближением к месту поступления или синтеза метаболита. Наконец, далеко не всегда обращают достаточное внимание на различие между общей концентрацией метаболита и концентрацией свободного метаболита. Например, общая концентрация 2,3-бисфосфоглицерата в эритроцитах очень велика, тогда как концентрация свободного бисфосфоглицерата в этих клетках сравнима с его концентрацией в других тканях. Эритроциты содержат приблизительно 5 ммолей гемоглобина, которые связывают 1 моль бисфосфоглицерата на моль дезоксигенированного тетрамера. Поэтому при **общем** содержании бисфосфоглицерата 4 ммоля концентрация **свободного** бисфосфоглицерата в эритроцитах венозной крови оказывается значительно меньше. Подобные же явления наблюдаются и в случае других метаболитов в присутствии эффективно связывающих их белков, значительно понижающих концентрацию свободных метаболитов.

Кинетический анализ Михаэлиса — Ментен основан на предположении, что общая концентрация субстрата равна концентрации свободного субстрата. Как мы видим, in vivo это предположение может не выполняться, поскольку в этом случае концентрация свободного субстрата часто бывает примерно того же порядка, что и концентрация фермента.

Ионы металлов, играющие каталитическую и структурную роль в действии многих ферментов (в их число попадает свыше четверти всех известных ферментов, см. гл. 9), могут осуществлять и регуляторные функции, особенно в тех случаях, когда субстратом служит ATP. В реакциях, в которых в качестве субстрата фигурирует комплекс между ATP и ионом металла, максимальная активность чаще всего наблюдается при молярном отношении ATP/металл $\simeq 1$. Избыток металла или избыток ATP оказывает ингибирующее действие. Поскольку нуклеозидди- и трифосфаты образуют прочные комплексы с двухвалентными катионами, внутриклеточные концентрации нуклеотидов сказываются и на внутриклеточных концентрациях свободных ионов металлов, а следовательно, и на активности некоторых ферментов. Например, в отсутствие ионов металлов глутаминсинтаза в клетках *E. coli* принимает «релаксированную», каталитически неактивную конформацию. Ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} превращают синтазу в активную, «напряженную» форму. Кроме того, аденилирование синтазы меняет ее специфичность — фермент отдает предпочтение уже не Mg^{2+}, а Mn^{2+}. И наконец, активность аденилированного фермента становится чувствительной к отношению ATP/Mg^{2+}, тогда как неаденилированная форма этой особенностью не обладает.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

Принципы

Каталитическая активность некоторых **регуляторных ферментов** может модулироваться низкомолекулярными аллостерическими эффекторами, обычно имеющими либо незначительное структурное сходство с субстратами или с коферментами регулируемого ими фермента, либо не имеющими его вообще. Ингибирование фермента, катализирующего одну из реакций в цепи, конечным продуктом этой цепи называют **ингибированием по принципу обратной связи**. В цепи реакций биосинтеза D из A, катализируемой ферментами Enz_1, ... Enz_3:

$$A \xrightarrow{Enz_1} B \xrightarrow{Enz_2} C \xrightarrow{Enz_3} D,$$

при высоких концентрациях D обычно наблюдается ингибирование превращения A в B. Это не простое «обращение» реакции, связанное с накоплением промежуточных продуктов, а следствие того, что продукт D способен связываться с ферментом Enz_1, выступая в качестве его ингибитора. Таким образом, D действует как **отрицательный аллостерический эффектор** фермента, или **ингибитор**, действующий **по принципу обратной связи**. Следовательно, ингибирование Enz_1 под действием D регулирует синтез D. Обычно D связывается с ингибируемым ферментом **в аллостерическом центре**, удаленном от каталитического центра.

В кинетическом плане ингибирование по принципу обратной связи может быть конкурентным, неконкурентным, частично конкурентным и смешанным. Ингибирование по принципу обратной связи

характерно для биосинтетических путей. **Очень часто ингибитор, действующий по принципу обратной связи, является последней малой молекулой перед синтезом макромолекулы** (например, аминокислотой, если речь идет о синтезе белков, или нуклеотидом в синтезе нуклеиновых кислот). **Регуляция по принципу обратной связи обычно происходит на первой функционально необратимой[1] стадии, уникальной для данной цепи реакций биосинтеза.**

Примерами ингибирования по принципу обратной связи в микроорганизмах могут служить ингибирование фосфорибозил: ATP — пирофосфорилазы гистидином, антранилатсинтазы — триптофаном, аспартаттранскарбамоилазы — под действием CTP. В каждом случае регуляторный фермент участвует в цепи реакций биосинтеза единственного конечного продукта — His, Trp или CTP.

Цепь реакций биосинтеза часто бывает разветвленной — ее первые реакции дают начало синтезу сразу двух или большего числа метаболитов. На рис. 10.4 указаны вероятные участки в разветвленной цепи биосинтеза, по которым осуществляется простое ингибирование по принципу обратной связи (ингибиторами могут служить аминокислоты, пурины или пиримидины). S_1, S_2 и S_3 являются предшественниками всех четырех конечных продуктов (A, B, C и D), S_4 — предшественником B и C, а S_5 — предшественником только D. Последовательности

$$S_3 \rightarrow A,$$
$$S_4 \rightarrow B,$$
$$S_4 \rightarrow C,$$
$$S_3 \rightarrow S_5 \rightarrow D$$

являются линейными и могут подвергаться ингибированию конечными продуктами по принципу обратной связи.

Более тонкая регуляция осуществляется с помощью **множественных петель обратной связи** (рис. 10.5). Например, если B присутствует в избытке, то снижается потребность в S_2. Следовательно, способность B ингибировать процесс, в котором сам этот продукт образуется, представляется биологически целесообразной. Однако, если избыток B ингибирует не только реакции, которые связаны исключительно с синтезом B, но и те реакции, которые одновременно ведут к синтезу A, C и D, то он будет препятствовать синтезу всех четырех продуктов. Это, конечно, нецелесообразно. Впрочем, сформировались механизмы, позволяющие преодолеть эту трудность.

Существует несколько вариантов ингибирования по принципу обратной связи. При **кумулятивном ингибировании** ингибирующее действие двух и более конечных продуктов на один и тот же регулируемый фермент строго аддитивно.

[1] Имеется в виду реакция, равновесие которой (в термодинамическом смысле) сильно смещено в одну сторону, т.е. реакция, характеризующаяся большим по величине отрицательным значением ΔG.

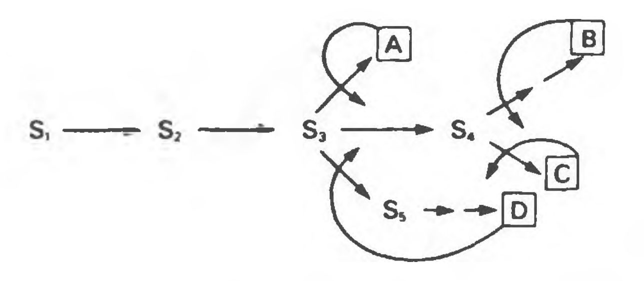


Рис. 10.4. Ингибирование по принципу обратной связи на различных участках разветвленного биосинтетического пути. S_1—S_5 — промежуточные соединения, образующиеся в ходе биосинтеза конечных продуктов A—D. Прямые стрелки соответствуют ферментам, катализирующим указанные превращения. Кривыми стрелками указаны петли обратной связи и вероятные участки ингибирования по принципу обратной связи специфическими конечными продуктами.

В случае **согласованного** или **мультивалентного ингибирования** полное ингибирование наблюдается только тогда, когда в избытке одновременно присутствуют два или более конечных продукта.

При **кооперативном ингибировании** ингибирующее действие на регуляторный фермент оказывает избыток каждого из конечных продуктов, но **ингибирующее действие сразу двух и более конечных продуктов намного превосходит аддитивный эффект, характерный для кумулятивного ингибирования**.

Еще один вариант регуляции наблюдается в случае ферментов аспартатного семейства: оно включает **множественные формы ферментов** (изозимы), каждый из которых имеет свои регуляторные характеристики. В *E. coli* синтезируются три аспартокиназы. Одна из них (AK_L) специфически и полностью ингибируется лизином, другая (AK_T) — треонином, а третья (AK_H) — гомосерином, предшественником Met, Thr и Ile (рис. 10.6). Избыток Lys ингибирует AK_L, что приводит к снижению синтеза β-аспартилфосфата. Но одного только этого еще недо-

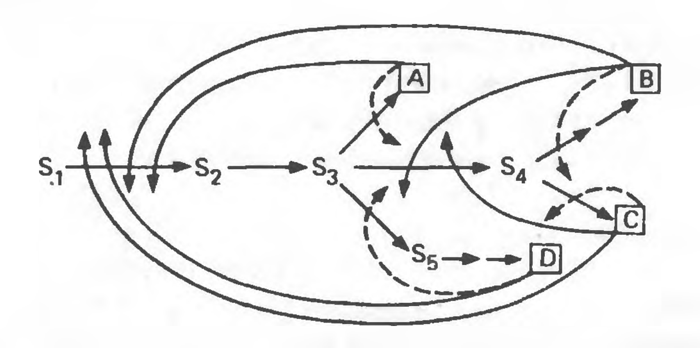


Рис. 10.5. Множественное ингибирование по принципу обратной связи на различных участках разветвленного биосинтетического пути. Помимо простых петель обратной связи (кривые штриховые стрелки) указаны петли (кривые сплошные стрелки), регулирующие активность ферментов, общих для процессов биосинтеза нескольких конечных продуктов.

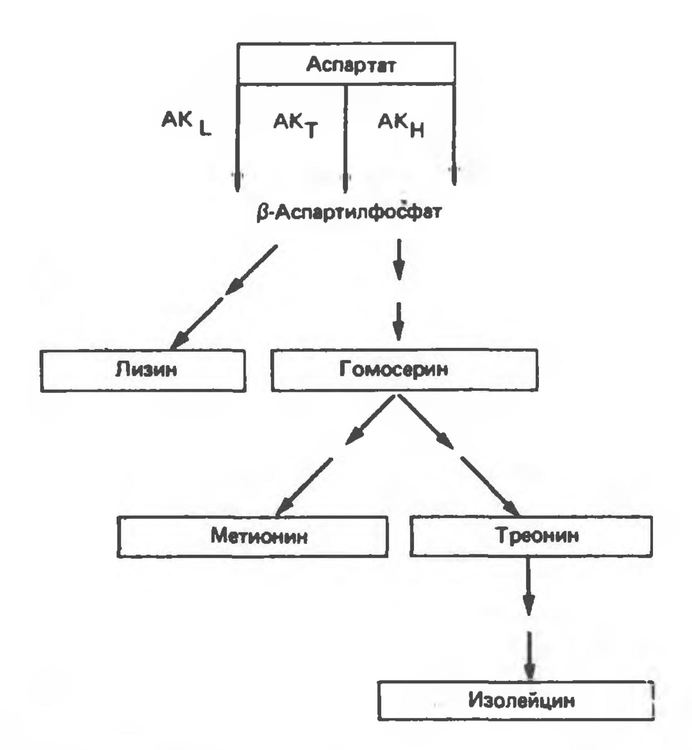


Рис. 10.6. Регуляция активности аспартокиназы (АК) в клетках *E.coli*. Изоформы фермента подвергаются избирательному ингибированию отдельными конечными продуктами — лизином (AK_L), треонином (AK_T) и гомосерином (AK_H).

статочно, чтобы направить метаболиты на синтез гомосерина и последующих продуктов. Переключение на этот канал биосинтеза происходит с помощью ингибирования по принципу обратной связи ферментов, участвующих в следующих звеньях пути биосинтеза. Лизин ингибирует также первый фермент в последовательности реакций, ведущих от β-аспартилфосфата к лизину. Это облегчает неограниченный синтез гомосерина, а, следовательно, также треонина и изолейцина. Следующее место регуляции находится на участке разветвления, из которого одна ветвь ведет к метионину, а другая — к треонину и изолейцину.

О том, что рассмотренные варианты регуляции метаболизма реально функционируют, свидетельствуют данные о характере ингибирования конечными продуктами пути биосинтеза, начинающегося с аспартата, у различных бактерий (табл. 10.2).

Наиболее полно изученный аллостерический фермент, **аспартат-транскарбамоилаза**, катализирует первую реакцию, уникальную для биосинтеза пиримидинов (рис. 10.7). Аспартат-транскарбамоилаза (АТКаза) ингибируется по принципу обратной связи цитидинтрифосфатом (СТР). После обработки ртутьсодержащими реагентами АТКаза теряет чувствительность к СТР, но сохраняет полную активность при синтезе карбамоиласпартата. Это означает, что СТР связывается не в тех участках, где находятся центры связывания субстратов, а в специальном аллостерическом центре. АТКаза состоит из двух каталитических и трех или четырех регуляторных протомеров. Каждый каталитический протомер содержит

Таблица 10.2. Варианты аллостерической регуляции аспартокиназы

Организм	Ингибитор, действующий по принципу обратной связи	Репрессор
E. coli (киназа I)	Гомосерин	
E. coli (киназа II)	Lys	Lys
E. coli (киназа III)	Thr	
R. rubrum	Thr	
B. subtilis	Thr + Lys	

четыре аспартатсвязывающих центра, а каждый регуляторный — по меньшей мере два СТР-связывающих (регуляторных) центра. Каждый тип протомеров находится под независимым генетическим контролем. Это было показано путем отбора мутантов, лишенных нормального контроля со стороны СТР; из этих мутантов были получены ревертанты, обладающие практически нормальными регуляторными свойствами.

Данные о существовании аллостерических центров у регуляторных ферментов

Примерно в 1963 г. Моно обратил внимание на отсутствие структурного сходства между ингибитором, действующим на фермент по принципу обратной связи, и субстратом этого фермента. Отсутствие изостеричности с субстратом позволяет говорить об **аллостеричности** соответствующих эффекторов. Ис-

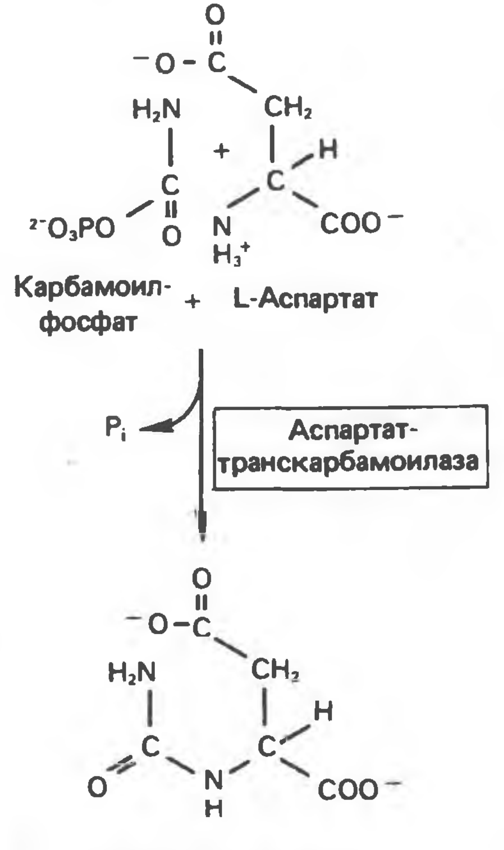


Рис. 10.7. Реакция, катализируемая аспартат-транскарбамоилазой (АТКазой).

ходя из этого, Моно предположил, что ферменты, регулируемые такими **аллостерическими эффекторами** (в частности, ингибиторами по принципу обратной связи), связывают эффектор в **аллостерическом центре**, физически не совпадающем с каталитическим центром. Таким образом, **аллостерические ферменты**—это ферменты, активность каталитического центра которых изменяется под действием аллостерических эффекторов, связывающихся в аллостерическом центре. Данные о наличии у регуляторных ферментов физически обособленных аллостерических центров сводятся к следующему.

1. Регуляторные ферменты после модификации химическими или физическими методами часто становятся нечувствительны к аллостерическим эффекторам, сохраняя каталитическую активность. Показана избирательная денатурация аллостерических центров при действии на ферменты ртутьсодержащих реагентов, мочевины, рентгеновских лучей, протеолитических ферментов, растворов с экстремальными значениями ионной силы или pH, при длительном хранении при 0—5° С, замораживании или нагревании.

2. Аллостерические эффекторы часто защищают **каталитический** центр от денатурации в условиях, когда субстрат такого защитного действия не оказывает. Трудно представить себе ситуацию, при которой эффектор, связываясь в каталитическом центре, защищает фермент, а субстрат такой способностью не обладает. Поэтому естественнее предположить, что эффектор связывается в другом, аллостерическом, центре фермента.

3. Обнаружены мутантные клетки бактерий и млекопитающих, в которых регуляторные ферменты имели существенно иные регуляторные свойства, чем ферменты из клеток дикого типа, но обладали в точности такими же каталитическими свойствами. Отсюда следует, что структура аллостерического и каталитического центров детерминируется разными участками гена.

4. Показано, что связывание субстратов и аллостерических эффекторов с регуляторным ферментом происходит независимо.

5. В некоторых ферментах (например, в АТКазе) аллостерический и каталитический центры локализованы в разных протомерах.

Кинетика аллостерического ингибирования

На рис. 10.8 представлены зависимости скорости реакции, катализируемой типичным аллостерическим ферментом, от концентрации субстрата в присутствии и в отсутствие аллостерического ингибитора. В отсутствие ингибитора наблюдается гиперболическая кривая насыщения. В его присутствии кривая приобретает сигмоидный вид; при высоких концентрациях субстрата скорость реакции может достигать значений, близких к тем, которые наблюдаются в отсутствие ингибитора. Обратите внимание на аналогию, которая прослеживается в этом случае с кривыми насыщения кислородом миоглобина и гемоглобина (гл. 6).

По данным кинетического анализа, ингибирование по принципу обратной связи может быть конкурентным, неконкурентным, частично конкурентным или может носить иной характер. Если при высоких концентрациях S активность фермента примерно одинакова в присутствии и в отсутствие аллостерического ингибитора, то кинетика внешне сходна с кинетикой конкурентного ингибирования. Однако, поскольку кривая насыщения субстратом все-таки носит сигмоидный, а не гиперболический характер, метод построения графиков в обратных координатах для аллостерических ингибиторов непригоден; он предложен для конкурентного ингибирования **в каталитическом центре**. Поскольку аллостерические ингибиторы связываются с ферментом в другом (аллостерическом) центре, исходная кинетическая модель утрачивает силу.

Сигмоидный характер зависимости *V* от [S] в присутствии аллостерического ингибитора обусловлен эффектом **кооперативности**. При низких концентрациях *S* активность в присутствии ингибитора существенно ниже, чем в его отсутствие. Однако при увеличении [S] ингибирующее действие становится менее выраженным. Такая же кинетика наблюдается, когда имеются два или больше взаимодействующих субстратсвязывающих центра: присутствие молекулы субстрата в одном каталитическом центре облегчает связывание молекулы второго субстрата в другом центре. Кооперативность связыва-

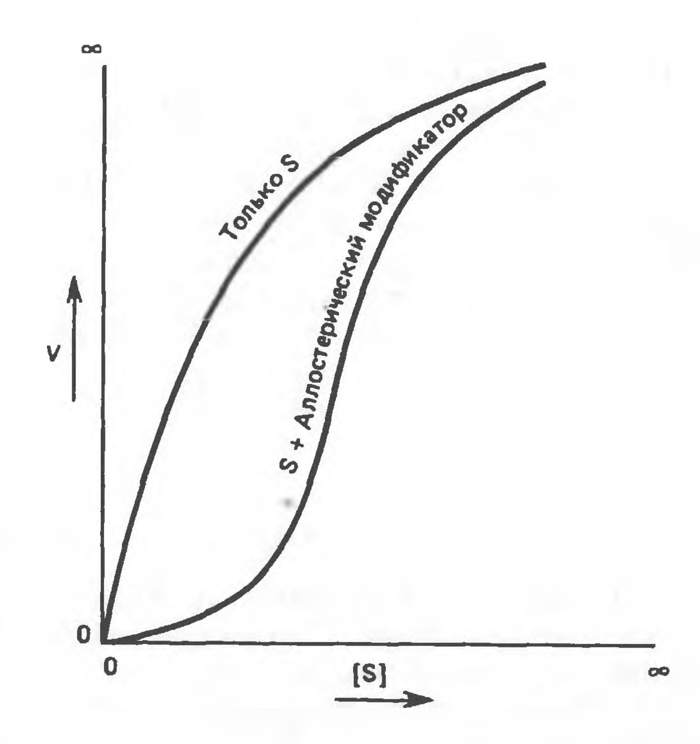


Рис. 10.8. Сигмоидная кинетическая кривая насыщения субстратом в присутствии аллостерического ингибитора.

ния субстратов была описана в гл. 6 на примере гемоглобина. Сигмоидный характер кривой насыщения гемоглобина кислородом обусловлен кооперативными взаимодействиями четырех связывающих O_2 центров, локализованных в разных протомерах.

Модели аллостерии

Попытки описать кинетику аллостерического ингибирования как «конкурентную» или «неконкурентную» по отношению к субстрату основаны на чисто механической аналогии, которая может ввести в заблуждение. Поэтому мы будем говорить о двух классах регуляторных ферментов — ферментах К-ряда и ферментах V-ряда. Насыщение субстратом аллостерических ферментов К-ряда выглядит как конкурентный процесс в том смысле, что $K_М$ увеличивается (уменьшается сродство к субстрату), и при этом значение V_{max} никак не изменяется. В случае аллостерических ферментов V-ряда уменьшается V_{max} (снижается каталитическая эффективность), но кажущееся значение $K_М$ остается неизменным. Изменения $K_М$ или V_{max}, по всей вероятности, обусловлены конформационными изменениями в каталитическом центре, вызванными связыванием аллостерического ингибитора в аллостерическом центре. В аллостерических ферментах К-ряда эти конформационные изменения приводят к ослаблению связи между субстратом и субстратсвязывающими остатками. В аллостерических ферментах V-ряда основной эффект заключается в изменении ориентации каталитических остатков, что приводит к понижению V_{max}. Однако могут наблюдаться и промежуточные случаи, когда конформационные изменения сказываются и на $K_М$, и на V_{max}.

Для описания регуляции аллостерических ферментов были предложены различные модели, однако вряд ли можно выбрать какую-то одну, способную объяснить поведение всех регуляторных ферментов. Поскольку сигмоидный характер кривой насыщения субстратом влечет за собой определенные регуляторные преимущества, любая мутация, приводящая к сигмоидной кривой насыщения, будет иметь тенденцию к закреплению в популяции. Едва ли можно ожидать, что все эти мутации детерминируют один и тот же механизм ингибирования. Поэтому сигмоидность кинетики еще ничего не говорит о механизме ингибирования.

Физиологические последствия кооперативности

Кооперативность связывания субстратов приводит к таким же последствиям, как и кооперативность связывания O_2 гемоглобином. При низких концентрациях субстрата аллостерический эффектор является мощным ингибитором. Он, следовательно, оказывает наиболее эффективное регулирующее воздействие как раз тогда, когда в нем имеется наибольшая необходимость: при низких внутриклеточных концентрациях субстрата. По мере повышения концентрации субстрата необходимость в строгой регуляции уменьшается, поэтому степень ингибирования понижается, что приводит к образованию большего количества продукта. По аналогии с гемоглобином сигмоидная кривая насыщения субстратом в присутствии ингибитора означает, что относительно малые изменения концентрации субстрата влекут за собой большие изменения активности. Это обеспечивает тонкую регуляцию каталитической активности при малых изменениях концентрации субстрата. Наконец, как и при насыщении кислородом гемоглобинов разных видов животных, для регуляторных ферментов из разных источников сигмоидные кривые насыщения могут быть сдвинуты влево или вправо; это обеспечивает лучшее соответствие тем концентрациям субстрата, которые преобладают in vivo.

Регуляция по принципу обратной связи в клетках млекопитающих

В клетках млекопитающих, так же как и в бактериальных клетках, конечные продукты регулируют свой собственный синтез по принципу обратной связи. В некоторых случаях (в частности, в случае АТКазы) ингибирование по принципу обратной связи направлено на первый из ферментов биосинтетической цепи. Однако мы должны различать понятия **регуляции по принципу обратной связи** — общий термин, не содержащий никаких указаний на механизм,— и **ингибирования по принципу обратной связи** — механизм регуляции многих ферментов бактерий и млекопитающих путем ингибирования. Например, поступающий с пищей холестерол подавляет свой собственный синтез из ацетата в тканях млекопитающих. Этот тип регуляции, однако, не направлен непосредственно на ингибирование первого фермента пути биосинтеза холестерола. Ингибирование затрагивает один из ферментов (HMG-CoA-редуктазу); функционирующий на ранних стадиях биосинтеза механизм включает подавление холестеролом или его метаболитами экспрессии генов, кодирующих образование HMG-CoA-редуктазы. Холестерол, непосредственно добавленный в систему с HMG-CoA-редуктазой, никакого действия на ее каталитическую активность не оказывает.

КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Общие принципы

Обратимое изменение каталитической активности ферментов может осуществляться путем кова-

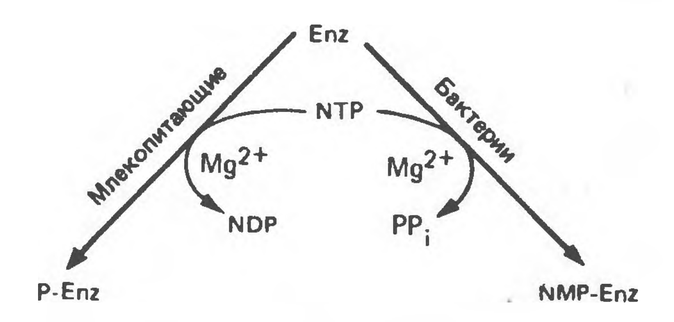


Рис. 10.9. Регуляция ферментативной активности путем ковалентной модификации. Слева — фосфорилирование, справа — присоединение нуклеотида. В обоих процессах нуклеозидтрифосфатом (NTP) обычно служит ATP.

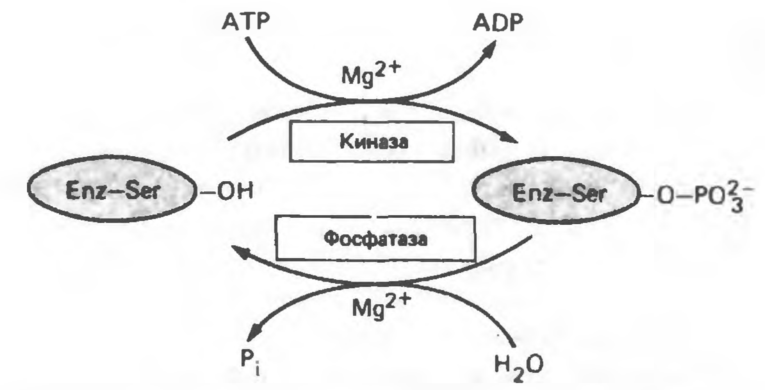


Рис. 10.10. Ковалентная модификация, регулирующая работу фермента и осуществляемая путем фосфорилирования/дефосфорилирования остатка серина.

лентного присоединения фосфатной группы (преобладает у млекопитающих) или нуклеотида (преобладает у бактерий). Ферменты, подверженные ковалентной модификации, которая сопровождается изменением их активности, называют обратимо модифицируемыми ферментами (рис. 10.9).

Обратимо модифицируемые ферменты могут находиться в двух состояниях, одно из которых характеризуется высокой, а другое — низкой каталитической эффективностью. В зависимости от конкретного случая более активным катализатором может быть либо фосфо-, либо дефосфофермент (табл. 10.3).

Участки фосфорилирования

Обычно фосфорилируется специфический остаток серина и образуется остаток О-фосфосерина; реже фосфорилируется остаток тирозина с образованием остатка О-фосфотирозина. Хотя обратимо модифицируемый фермент может содержать много остатков серина или тирозина, фосфорилирование происходит в высшей степени избирательно и затрагивает лишь небольшое число (1—3) остатков. Эти участки, по всей вероятности, не являются частью каталитического центра; мы, таким образом, имеем еще один пример аллостерических эффектов.

Модифицирующие (конвертирующие) ферменты

Фосфорилирование и дефосфорилирование катализируется протеинкиназами и протеинфосфатазами соответственно (рис. 10.10). В некоторых случаях конвертирующие ферменты сами являются обратимо модифицируемыми ферментами (табл. 10.3). Так, существуют киназы и фосфатазы протеинкиназы, катализирующие модификацию конвертирующих белков (протеинкиназ). Данные о принадлежности к обратимо модифицируемым ферментам протеинфосфатаз менее убедительны, хотя их активность подвержена регуляции. Активность протеинкиназ и протеинфосфатаз находится под гормональным контролем и регулируется также нервной системой, однако детали механизма этой регуляции неясны.

Таблица 10.3. Некоторые ферменты млекопитающих, каталитическая активность которых в фосфорилированном и дефосфорилированном состояниях различна (E — дефосфофермент, EP — фосфофермент)

Фермент	Состояние активности	
	низкая	высокая
Ацетил-CoA-карбоксилаза	EP	E
Гликогенсинтаза	EP	E
Пируватдегидрогеназа	EP	E
HMG-CoA-редуктаза	EP	E
Гликогенфосфорилаза	E	EP
Цитратлиаза	E	EP
Пируватдегидрогеназа	E	EP
Киназа фосфорилазы b	E	EP
Киназа HMG-CoA-редуктазы	E	EP

Энергетика

Реакции, представленные на рис. 10.10, подобны реакциям превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат или фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-бисфосфат (см. гл. 18). При фосфорилировании и последующем дефосфорилировании 1 моля субстрата (фермента или сахара) происходит гидролиз 1 моля ATP.

Активность киназ (катализирующих реакции 1 и 3) и фосфатаз (катализирующих реакции 2 и 4) должна в свою очередь регулироваться — в противном случае их совместное действие будет приводить к катализу неконтролируемого гидролиза ATP.

1. Глюкоза + ATP → ADP + Глюкозо-6-P
2. H_2O + Глюкозо-6-P → P_i + Глюкоза

$$H_2O + ATP \rightarrow ADP + P_i$$

3. Enz-Ser-OH + ATP → ADP + Enz-Ser-O-P
4. H_2O + Enz-Ser-O-P → P_i + Enz-Ser-OH

$$H_2O + ATP \rightarrow ADP + P_i$$

Аналогия с ингибированием по принципу обратной связи

Регуляция ферментативной активности путем фосфорилирования и дефосфорилирования в известной мере аналогична регуляции по принципу обратной связи. Оба типа регуляции обеспечивают быстрое изменение потока метаболитов в ответ на тот или иной физиологический сигнал; и в том и в другом случае экспрессия генов не затрагивается. При обоих типах регуляции действие направлено на ферменты начальных этапов многостадийной цепи метаболических реакций, чаще всего принадлежащих одному пути биосинтеза, причем не на каталитические, а на аллостерические центры. Однако ингибирование по принципу обратной связи направлено избирательно на один фермент и не зависит от гормональной или нервной регуляции. Напротив, регуляция ферментов млекопитающих путем фосфорилирования — дефосфорилирования распространяется на несколько белков, осуществляется при участии АТР или других нуклеозидтрифосфатов и находится под прямым нервным и гормональным контролем.

ЛИТЕРАТУРА

Gumaa K. A., McLean P., Greenbaum A. L. Compartmentation in relation to metabolic control in liver, Essays Biochem., 1971, **7**, 39.

Kun E., Grisolia S. Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells, Wiley, 1972.

Nestler E. J., Greengard P. Protein phosphorylation in the brain, Nature, 1983, **305**, 583.

Newsholme E. A., Stuart C. Regulation in Metabolism, Wiley, 1973.

Schimke R. T., Doyle D. Control of enzyme levels in animal tissues, Annu. Rev. Biochem., 1970, **39**, 929.

Soderling T. R. Role of hormones and protein phosphorylation in metabolic regulation, Fed. Proc., 1982, **41**, 2615.

Sols A., Marco R. Concentrations of metabolites and binding sites: Implications in metabolic regulation, Curr. Top. Cell. Regul., 1970, **2**, 227.

Stanbury J. B. et al. (eds.) The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., McGraw-Hill, 1983.

Umbarger H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation, Annu. Rev. Biochem, 1978, 47, 533.

Weber G. (ed.) Advances in Enzyme Regulation, Vols. 1—9, Pergamon Press, 1963—1987.

Раздел II
Биоэнергетика и метаболизм углеводов и липидов

Глава 11

Биоэнергетика

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Биоэнергетика, или биохимическая термодинамика, занимается изучением энергетических превращений, сопровождающих биохимические реакции. Ее основополагающие принципы позволяют объяснить, почему протекают одни реакции и не осуществляются другие. Небиологические системы могут совершать работу за счет тепловой энергии, биологические же системы функционируют в изотермическом режиме и для осуществления процессов жизнедеятельности используют химическую энергию.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Необходимая для функционирования организма животного энергия должна поступать к нему в виде подходящего «топлива». Выяснение вопроса о том, каким образом организм извлекает эту энергию из пищевых продуктов, является основой для понимания процессов нормального питания и метаболизма. Истощение энергетических ресурсов приводит к голодной смерти, а некоторые формы нарушения питания обусловлены энергетическим дисбалансом (пеллагра, кахексия). Скорость потребления энергии, характеризуемая скоростью метаболических процессов, регулируется гормонами щитовидной железы. Запасание в организме избыточной энергии в форме питательных веществ приводит к ожирению, весьма распространенному в западных странах.

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ И ЗАКОНЫ ТЕРМОДИНАМИКИ

Изменение свободной энергии (ΔG) — это та часть изменения внутренней энергии системы, которая может превращаться в работу; иначе говоря, это полезная энергия — в химических системах ее называют **химическим потенциалом**.

Первый закон термодинамики гласит: **внутренняя энергия системы вместе с ее окружением остается постоянной**. Это одна из формулировок закона сохранения энергии. Она утверждает, что при любых изменениях системы внутренняя энергия не утрачивается и не приобретается. Вместе с тем внутри рассматриваемой системы энергия может переходить от одной ее части к другой или превращаться из одной формы в другую. Например, химическая энергия может переходить в тепло, превращаться в электрическую энергию, энергию излучения или в механическую энергию.

Второй закон термодинамики гласит: **энтропия системы при самопроизвольных процессах возрастает. Энтропия** служит мерой неупорядоченности, хаотичности системы и достигает максимума, когда система приходит в истинное равновесие. При постоянных температуре и давлении соотношение между изменением свободной энергии системы (ΔG) и изменением энтропии (ΔS) представляется следующим выражением, которое объединяет оба закона термодинамики:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

где ΔH — изменение **энтальпии** (теплоты), T — абсолютная температура.

В условиях, при которых протекают биохимические реакции, ΔH приблизительно равно ΔE — изменению внутренней энергии системы в результате реакции. В этих условиях приведенное выше выражение можно записать в виде

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S.$$

Если ΔG отрицательно, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют **экзергони-**

ческими. Если к тому же ΔG велико по абсолютной величине, то реакция идет практически до конца и ее можно рассматривать как необратимую. Если же ΔG положительно, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне; такая реакция называется **эндергонической**. Если к тому же ΔG велико, то система является устойчивой и реакция в этом случае практически не осуществляется. При **ΔG равном нулю** система находится в равновесии.

При концентрациях реагентов 1,0 моль/л изменение свободной энергии обозначают как $\Delta G°$ — **изменение стандартной свободной энергии**. Для биохимических реакций стандартным считается состояние при pH 7,0. Изменение стандартной свободной энергии в таком стандартном состоянии обозначается как $\Delta G^{\circ\prime}$.

Изменение стандартной свободной энергии можно найти, зная константу равновесия K'_{eq}:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2{,}303\ RT \log K'_{eq},$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура (см. с. 84). Важно отметить, **что ΔG может быть больше или меньше $\Delta G^{\circ\prime}$ в зависимости от концентрации реактантов**.

Следует ясно понимать, что в присутствии ферментов биохимические реакции лишь быстрее достигают равновесия, **но конечные равновесные концентрации реактантов при этом не изменяются**.

СОПРЯЖЕНИЕ ЭНДЕРГОНИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С ЭКЗЕРГОНИЧЕСКИМИ

Жизненно важные процессы — реакции синтеза, мышечное сокращение, проведение нервного импульса, активный транспорт — получают энергию путем **химического сопряжения** с окислительными реакциями. Схематически такое сопряжение иллюстрирует рис. 11.1.

Превращение метаболита A в метаболит B сопровождается выделением свободной энергии. Оно сопряжено с другой реакцией — превращением метаболита C в метаболит D, которое может происходить лишь при поступлении свободной энергии. В случае когда энергия, выделяющаяся при распаде одного соединения, используется (не в форме теплоты) для синтеза другого соединения, соответствующие реакции уже нельзя характеризовать химическими терминами «экзотермические» и «эндотермические». Правильнее называть их **экзергоническими** и **эндергоническими** реакциями; эти термины показывают, что реакция сопровождается уменьшением свободной энергии или ее увеличением независимо от формы, в которой передается энергия. На практике эндергонический процесс не может протекать изолированно. Он должен быть компонентом сопряженной экзергонической/эндергонической системы, **которая в целом является экзергонической. Катаболические** превращения (распад или окисление «топливных» молекул) обычно являются экзергоническими реакциями, тогда как **анаболические** — эндергоническими. Совокупность катаболических и анаболических процессов и есть **метаболизм**.

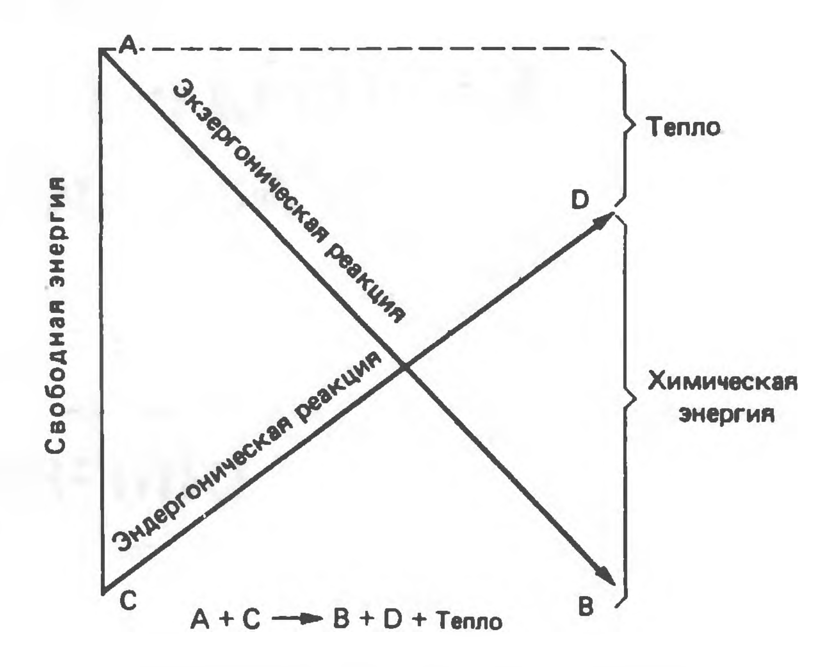


Рис. 11.1. Сопряжение экзергонической и эндергонической реакций.

Если реакция, представленная на рис. 11.1, идет слева направо, то процесс должен сопровождаться уменьшением свободной энергии, выделяющейся в форме тепла. Один из возможных механизмов сопряжения реакций состоит в образовании промежуточного соединения I, общего для обеих реакций:

$$A + C \rightarrow I \rightarrow B + D.$$

В биологических системах ряд экзергонических и эндергонических реакций сопрягаются именно таким способом. Следует отметить, что в системах такого типа заложен механизм регуляции скорости окислительных процессов, поскольку наличие общего промежуточного продукта для экзергонической и эндергонической реакций создает условия, при которых скорость потребления продукта D по закону действующих масс определяет скорость окисления A. Именно подобным путем осуществляется **дыхательный контроль** — процесс, позволяющий организму избегать неконтролируемого самоокисления. Другим примером сопряжения являются дегидрогеназные реакции (реакции отщепления атомов водорода), сопрягающим соединением в которых является промежуточный переносчик атомов водорода (рис. 11.2).

Альтернативный механизм сопряжения экзергонического и эндергонического процессов состоит в синтезе соединения с высоким энергетическим потенциалом в ходе экзергонической реакции и после-

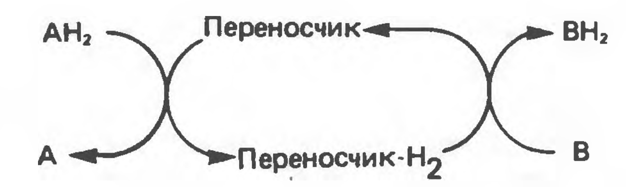


Рис. 11.2. Сопряжение дегидрогеназной и гидрогеназной реакций с помощью промежуточного переносчика.

дующем включении этого нового соединения в эндергоническую реакцию, что обеспечивает передачу свободной энергии от экзергонической реакции эндергонической (рис. 11.3).

На рис. 11.3 символом ~ Ⓔ обозначено соединение с высокой потенциальной энергией, а символом Ⓔ — соответствующее соединение с низкой потенциальной энергией. Определенное преимущество этого механизма состоит в том, что Ⓔ в отличие от I в предыдущем механизме может не иметь структурного сходства с A, B, C или D. Это позволяет ~ Ⓔ служить переносчиком энергии от большого числа экзергонических реакций к столь же большому числу эндергонических процессов, как это показано на рис. 11.4.

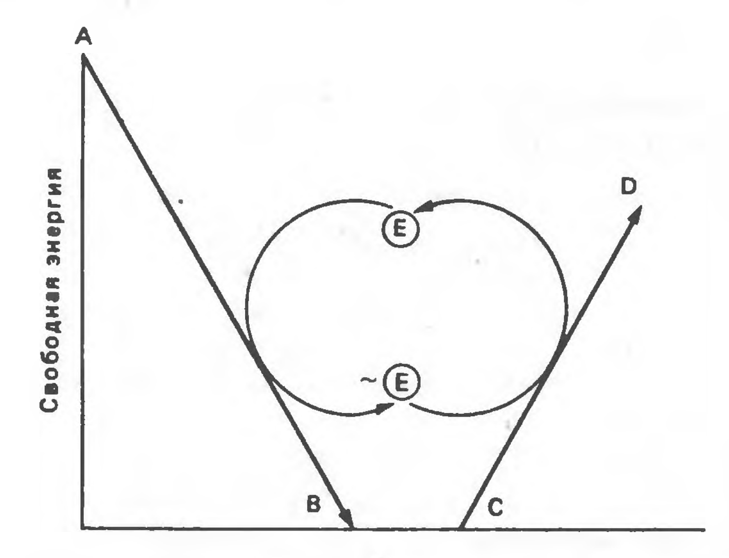


Рис. 11.3. Передача свободной энергии от экзергонической к эндергонической реакции с помощью высокоэнергетического интермедиата.

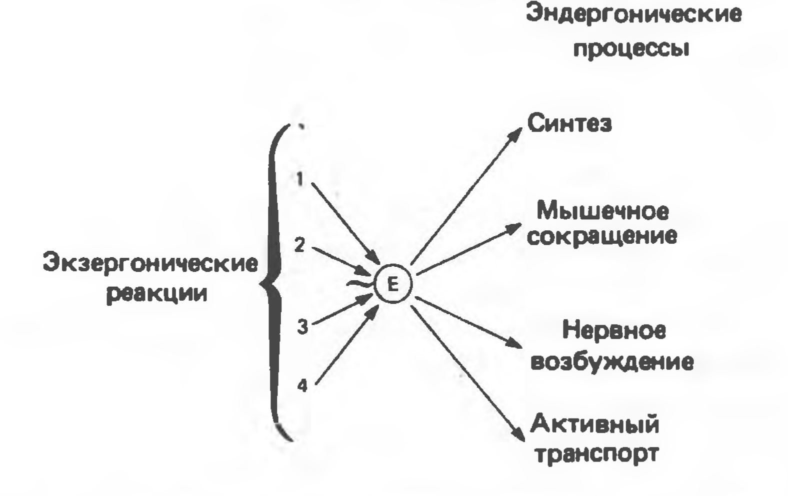


Рис. 11.4. Передача свободной энергии от экзергонических реакций к эндергоническим биологическим процессам с участием общего высокоэнергетического соединения.

В живых клетках главным высокоэнергетическим промежуточным продуктом (интермедиатом ~ Ⓔ) служит **аденозинтрифосфат (ATP)**.

РОЛЬ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ И В ПРОЦЕССАХ УЛАВЛИВАНИЯ ЭНЕРГИИ

Для поддержания процессов жизнедеятельности все организмы должны получать свободную энергию из внешней среды. У **автотрофных** организмов метаболизм сопряжен с простым экзергоническим процессом, протекающим в их окружении: зеленые растения используют энергию солнечного света; некоторые автотрофные бактерии существуют за счет реакции $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$. **Гетеротрофные** же организмы получают энергию в результате сопряжения метаболизма с процессом **распада сложных органических молекул**, поступающих извне. Во всех этих процессах центральную роль играет ATP, обеспечивающий передачу свободной энергии от экзергонических процессов к эндергоническим (рис. 11.3 и 11.4). Как видно из рис. 11.5, ATP — это нуклеотид, содержащий аденин, рибозу и три фосфатные группы. В реакциях, протекающих внутри клетки, ATP участвует в виде Mg^{2+}-комплекса (рис. 11.6).

Важная роль фосфатов в процессах метаболизма стала ясна после того, как были выяснены химические детали гликолиза и установлено, какую роль в этом процессе играют ATP, аденозиндифосфат (ADP) и неорганический фосфат (P_i). Вначале ATP рассматривали как переносчик фосфатных радикалов в процессе фосфорилирования. Роль ATP в биохимической энергетике была установлена в экспериментах, показывающих, что в процессе мышечного сокращения происходит распад ATP и креатинфосфата и что их ресинтез осуществляется за счет энергии, поступающей от протекающих в мышце окислительных процессов. Окончательную ясность внес Липман, который ввел представление о «богатых энергией фосфатах» и «богатой энергией фосфатной связи» и указал на их роль в биоэнергетике.

Рис. 11.5. Аденозинтрифосфат (ATP).

```
        Mg²⁺
       /    \
     O⁻     O⁻      O⁻
     |      |       |
⁻O—P—O—P—O—P—O—Аденозин
     ‖      ‖       ‖
     O      O       O
```

Рис. 11.6. Магниевый комплекс ATP (подобное строение имеет Mg-ADP).

Свободная энергия гидролиза ATP и других органических фосфатов

Стандартная свободная энергия гидролиза ряда биохимически важных органических фосфатов приведена в табл. 11.1. Сравнительную способность каждой из фосфатных групп к переходу на подходящий акцептор можно оценить по величине $\Delta G^{\circ\prime}$ гидролиза (измеряемой при 37° С). Как видно из таблицы, значение $\Delta G^{\circ\prime}$ для гидролиза концевого фосфата ATP, равное −30,5 кДж/моль, разделяет приведенные соединения на две группы. Одна группа — низкоэнергетические фосфаты; она представлена фосфорными эфирами, образующимися на промежуточных стадиях гликолиза,— их $\Delta G^{\circ\prime}$ меньше, чем у ATP. Другая группа соединений — «богатые энергией фосфаты» — имеет $\Delta G^{\circ\prime}$ больше, чем у ATP. Соединения этой группы, включая также ATP и ADP,— это обычно ангидриды (например, фосфатная группа в положении 1 1,3-бисфосфоглицерата), енолфосфаты (например, фосфоенолпируват) и фосфогуанидины (креатинфосфат, аргининфосфат). Другими биологически важными соединениями, которые классифицируются как «богатые энергией», являются тиоловые эфиры, образуемые коферментом А (в частности, ацетил-СоА), ацилпереносящий белок, эфиры аминокислот, участвующие в синтезе белков, S-аденозилметионин (активный метионин) и UDPGlc (уридиндифосфатглюкоза).

Таблица 11.1. Стандартная свободная энергия гидролиза некоторых биохимически важных органических фосфатов[1]

Соединение	$\Delta G^{\circ\prime}$	
	кДж/моль	ккал/моль
Фосфоенолпируват	−61,9	−14,8
Карбамоилфосфат	−51,4	−12,3
1,3-Бисфосфоглицерат (продукт: 3-фосфоглицерат)	−49,3	−11,8
Креатинфосфат	−43,1	−10,3
ATP → ADP + P_i	**−30,5**	**−7,3**
ADP → AMP + P_i	−27,6	−6,6
Пирофосфат	−27,6	−6,6
Глюкозо-1-фосфат	−20,9	−5,0
Фруктозо-6-фосфат	−15,9	−3,8
AMP	−14,2	−3,4
Глюкозо-6-фосфат	−13,8	−3,3
Глицерол-3-фосфат	−9,2	−2,2

[1] Значения ΔG для ATP и большинства других соединений взяты из работы Krebs, Kornberg, 1957. [Имеется перевод: Кребс Г., Корнберг Г. Превращение энергии в живых системах.— М.: Мир, 1959.] P_i — неорганический ортофосфат.

Высокоэнергетические фосфаты

Чтобы указать на присутствие высокоэнергетической фосфатной группы, Липман ввел символ ~Ⓟ, означающий наличие **высокоэнергетической** (макроэргической) **фосфатной связи**. Символ ~ означает, что перенос группы, присоединенной указанной связью, на подходящий акцептор сопровождается выделением большого количества свободной энергии. Иногда предпочитают вместо термина «высокоэнергетическая связь» использовать термин «потенциал переноса группы». ATP содержит две высокоэнергетические фосфатные группы, ADP — одну, тогда как фосфатная связь в AMP является низкоэнергетической связью (рис. 11.7).

Роль высокоэнергетических фосфатов как «энергетической валюты» клетки

Среднее положение ATP в таблице величин стандартной свободной энергии гидролиза (табл. 11.1) позволяет этому соединению служить донором высокоэнергетического фосфата для тех соединений, которые в таблице находятся ниже ATP. При наличии соответствующих ферментных систем ADP может акцептировать высокоэнергетический фосфат (с образованием ATP) от тех соединений, которые находятся в таблице выше ATP. Таким образом, **цикл ATP/ADP** связывает процессы, **генерирующие** ~Ⓟ, с процессами, **потребляющими** ~Ⓟ (рис. 11.8).

Имеются три главных источника ~Ⓟ, обеспечивающие **улавливание и запасание энергии**. 1. **Окислительное фосфорилирование**. Это наиболее важный в количественном отношении источник ~Ⓟ у аэробных организмов. Свободная энергия, необходимая для образования ~Ⓟ, генерируется в дыхательной окислительной цепи, функционирующей в митохондриях (с. 129). 2. **Гликолиз.** Суммарным результатом превращения одной молекулы глюкозы в лактат является образование двух ~Ⓟ (см. рис. 18.2) в ходе реакций, катализируемых фосфоглицераткиназой и пируваткиназой (рис. 11.9). 3. **Цикл лимонной кислоты**. Одна ~Ⓟ генерируется непосредственно в ходе цикла на стадии, катализируемой сукцинилтиокиназой (см. рис. 17.3).

Другая группа соединений, **фосфагены**, выступает в качестве резервуара высокоэнергетических фосфатов; к их числу относятся креатинфосфат, содержащийся в мышцах и в мозге позвоночных, и аргинин-

$$\text{Аденозин}-O-\overset{O^-}{\underset{O}{P}}-O\sim\overset{O^-}{\underset{O}{P}}-O\sim\overset{O^-}{\underset{O}{P}}-O^-$$

или Аденозин—Ⓟ~Ⓟ~Ⓟ

Аденозинтрифосфат (ATP)

$$\text{Аденозин}-O-\overset{O^-}{\underset{O}{P}}-O\sim\overset{O^-}{\underset{O}{P}}-O^-$$

или Аденозин—Ⓟ~Ⓟ

Аденозиндифосфат (ADP)

$$\text{Аденозин}-O-\overset{O^-}{\underset{O}{P}}-O^-$$

или Аденозин—Ⓟ

Аденозинмонофосфат (AMP)

Рис. 11.7. Структура ATP, ADP и AMP с указанием положения и числа высокоэнергетических связей (~).

фосфат, находящийся в мышцах беспозвоночных (табл. 11.1).

При физиологических условиях фосфагены поддерживают в мышцах необходимую концентрацию ATP в период его быстрого расходования как источника энергии для мышечного сокращения. С другой стороны, когда накапливается достаточно много ATP, реакция идет в направлении образования креатинфосфата, концентрация последнего повышается, и он выступает как форма хранения высокоэнергетического фосфата (рис. 11.10). Если же ATP служит донором фосфата при образовании соединений, имеющих более низкую свободную энергию гидролиза (табл. 11.1), то фосфатная группа становится низкоэнергетической, например:

$$\text{Глицерол} + \text{Аденозин}—Ⓟ \sim Ⓟ \sim Ⓟ \xrightarrow{\text{Глицеролкиназа}}$$

$$\text{Глицерол}—Ⓟ + \text{Аденозин}—Ⓟ \sim Ⓟ.$$

Биоэнергетика сопряженных реакций

Рассмотрим подробнее энергетику сопряженных реакций (рис. 11.1 и 11.3). Первую стадию гликолиза можно рассматривать как сопряженную реакцию (см. рис. 18.2). Фосфорилирование глюкозы свободным фосфатом с образованием глюкозо-6-фосфата — сильноэндергоническая реакция:

(1) Глюкоза + P_i → Глюкозо-6-фосфат + H_2O ($\Delta G^{\circ\prime}$ = + 13,8 кДж/моль).

Необходимо ее сопряжение с другой реакцией, экзергоничность которой больше, чем эндергоничность фосфорилирования глюкозы свободным ферментом. Такой реакцией является гидролиз ATP с отщеплением концевого фосфата:

(2) ATP → ADP + P_i ($\Delta G^{\circ\prime}$ = – 30,5 кДж/моль).

При сопряжении процессов (1) и (2) в реакции, катализируемой ферментом гексокиназой, фосфорилирование глюкозы легко протекает в физиологических условиях: равновесие реакции сильно сдвинуто вправо, и она практически необратима.

Глюкоза + ATP $\xrightarrow{\text{Гексокиназа}}$ Глюкозо-6-фосфат + ADP ($\Delta G^{\circ\prime}$ = – 16,7 кДж/моль).

Подобный механизм лежит в основе многих реакций «активации».

Взаимопревращение адениннуклеотидов

В большинстве клеток имеется фермент аденилаткиназа (миокиназа). Она катализирует обрати-

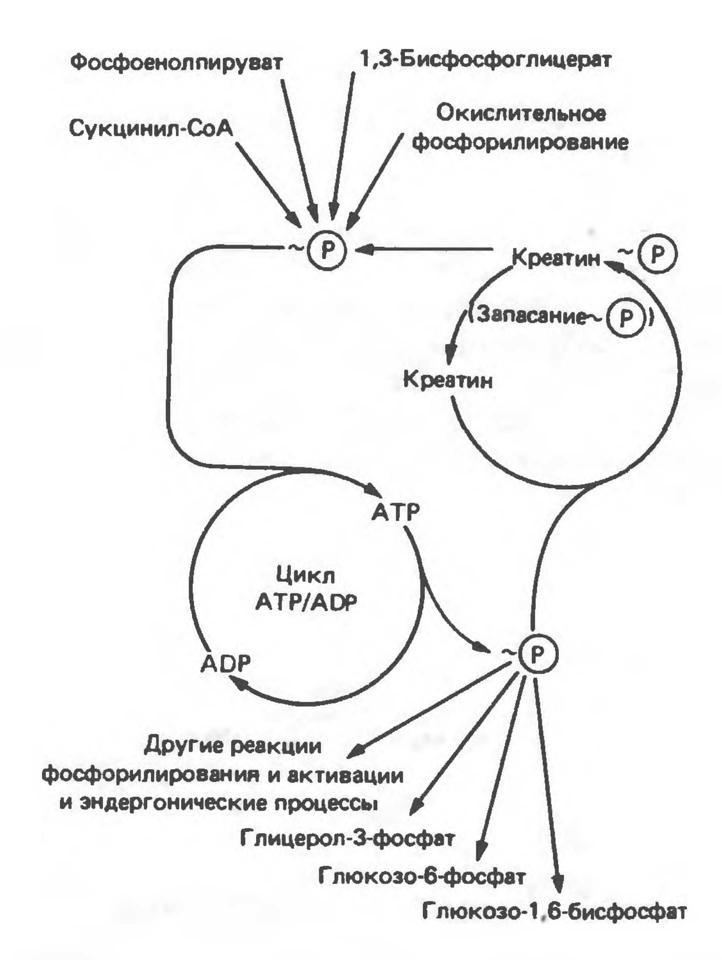


Рис. 11.8. Роль цикла ATP/ADP в системе переноса высокоэнергетического фосфата. Обратите внимание, что ~Ⓟ никогда не находится в свободном состоянии, а только переносится с одного соединения на другое.

Фосфоглицерат-киназа

$CO-O\sim (P)$ / H–C–OH / $CH_2-O-(P)$ ⇄ ADP → ATP ⇄ COO^- / H–C–OH / $CH_2-O-(P)$

1,3-Бисфосфоглицерат — 3-Фосфоглицерат

Пируват-киназа

COO^- / $C-O\sim(P)$ / $\|$ / CH_2 → (ADP → ATP) → COO^- / C–OH / $\|$ / CH_2 → Самопроизвольно → COO^- / C=O / CH_3

Фосфоенол-пируват — (Енол) Пируват — (Кето) Пируват

Рис. 11.9. Перенос высокоэнергетического фосфата от промежуточных продуктов гликолиза на ADP.

мое превращение ATP и AMP в ADP:

$$\underset{(ATP)}{\text{Аденозин}-(P)\sim(P)\sim(P)} + \underset{(AMP)}{\text{Аденозин}-(P)} \xrightleftharpoons{\text{Аденилат-киназа}} \underset{(2\,ADP)}{2\,\text{Аденозин}-(P)\sim(P)}.$$

Эта реакция выполняет три функции: 1) позволяет использовать высокоэнергетический фосфат ADP для синтеза ATP; 2) позволяет превратить AMP, образующийся в ряде реакций активации, идущих с участием ATP, в ADP путем рефосфорилирования; 3) приводит к повышению концентрации AMP в условиях снижения содержания ATP и служит метаболическим (аллостерическим) сигналом к повышению скорости катаболических реакций, что в свою очередь приводит к увеличению генерации ATP (с. 217).

(P)~N(H) / C=NH / H_3C–N / CH_2 / COOH ⇄ Креатинкиназа (ADP ⇄ ATP) ⇄ H_2N / C=NH / H_3C–N / CH_2 / COOH

($\Delta G^{0'} = -12{,}6$ кДж/моль)

Креатинфосфат — Креатин

Рис. 11.10. Перенос высокоэнергетического фосфата между ATP и креатином.

МЕТАБОЛИЗМ ПИРОФОСФАТА

Реакции с участием ATP, в ходе которых образуется AMP, сопровождаются образованием неорганического пирофосфата (PP_i); в качестве примера можно привести активацию длинноцепочечных жирных кислот:

$$ATP + CoA\cdot SH + R\cdot COOH \xrightarrow{\text{Ацил-CoA-синтетаза}} AMP + PP_i + R\cdot CO \sim SCoA.$$

Эта реакция сопровождается рассеянием свободной энергии в форме тепла, поэтому она идет слева направо. Такому направлению реакции способствует гидролитическое расщепление PP_i, катализируемое

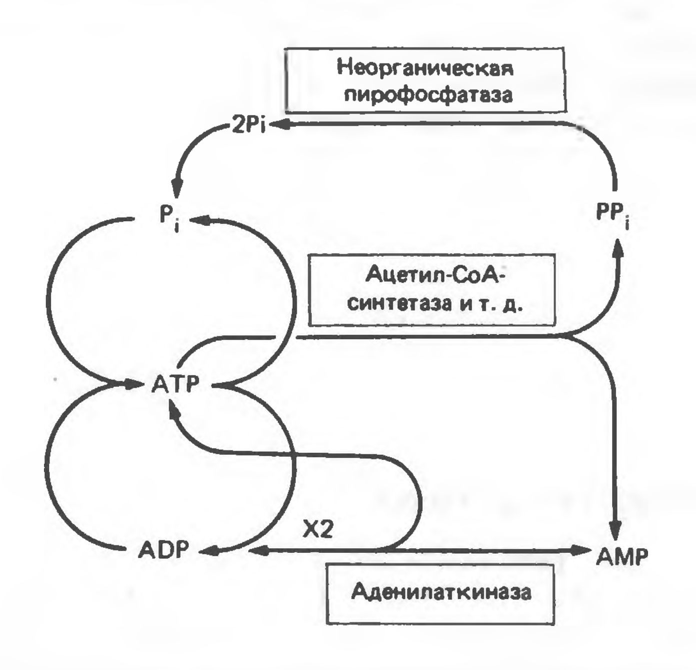


Рис. 11.11. Связь фосфатных циклов с взаимопревращением адениновых нуклеотидов.

неорганической пирофосфатазой; оно характеризуется большим значением $\Delta G^{0\prime}$ (– 4,6 ккал/моль). Отметим, что при активации с образованием пирофосфата происходит потеря двух ~ Ⓟ, а не одной, как при образовании ADP и P_i:

$$PP_i + H_2O \xrightarrow{\text{Неорганическая пирофосфатаза}} 2P_i.$$

Описанные выше реакции с участием фосфата и адениннуклеотидов схематически представлены на рис. 11.11.

Нуклеозидфосфаты, родственные ATP и ADP

При участии фермента **нуклеозиддифосфаткиназы** нуклеозидтрифосфаты, подобные ATP, но содержащие не аденин, а другое основание, могут синтезироваться из соответствующих дифосфатов:

$$ATP + UDP \xleftrightarrow{\text{Нуклеозиддифосфаткиназа}} ADP + UTP$$

(уридинтрифосфат)

$$ATP + GDP \longleftrightarrow ADP + GTP$$

(гуанозинтрифосфат)

$$ATP + CDP \longleftrightarrow ADP + CTP$$

(цитидинтрифосфат)

Все эти трифосфаты участвуют в происходящих в клетке реакциях фосфорилирования. **Нуклеозидмонофосфаткиназы**, специфичные к определенным пуриновым или пиримидиновым нуклеозидфосфатам, катализируют образование нуклеозиддифосфатов из соответствующих монофосфатов.

$$ATP + \text{Нуклеозид}—Ⓟ \xleftrightarrow{\text{Специфическая нуклеозидмонофосфаткиназа}} ADP +$$

$$+ \text{Нуклеозид}—Ⓟ \sim Ⓟ.$$

В частности, аденилаткиназа является специфической монофосфаткиназой.

ЛИТЕРАТУРА

Ernster L. (ed.) Bioenergetics, Elsevier, 1984.

Harold F. M. The Vital Force: A Study of Bioenergetics, Freeman, 1986.

Klotz I. M. Introduction to Biomolecular Energetics, Academic Press, 1986.

Krebs H. A., Kornberg H. L. Energy Transformations in Living Matter, Springer, 1957.

Lehninger A. L. Bioenergetics: The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2nd ed., Benjamin, 1971.

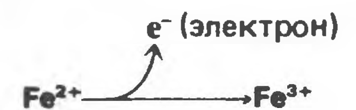
Глава 12

Биологическое окисление

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

В химии **окисление определяется как удаление электронов**, а **восстановление — как присоединение электронов**; это можно проиллюстрировать на примере окисления ферро-иона в ферри-ион:



Отсюда следует, что окисление всегда сопровождается **восстановлением акцептора электронов**. Этот принцип окислительно-восстановительных процессов в равной мере применим к биохимическим системам и характеризует природу процессов биологического окисления. Далее будут приведены примеры, показывающие, что многие процессы биологического окисления идут без участия молекулярного кислорода, например дегидрогеназные реакции.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Хотя некоторые бактерии (анаэробные) живут в отсутствие кислорода, жизнь высших животных полностью зависит от снабжения кислородом. Кислород используется главным образом в процессе дыхания — последнее можно определить как процесс улавливания клеткой энергии в виде АТР при протекании контролируемого соединения кислорода с водородом с образованием воды. Кроме того, молекулярный кислород включается в различные субстраты при участии ферментов, называемых оксигеназами; многие лекарства, посторонние для организма вещества и химические канцерогены (их называют ксенобиотиками, т.е. чужеродными соединениями) атакуются ферментами этого класса, которые в совокупности получили название системы цитохрома Р-450. Введением кислорода можно спасти жизнь больных, у которых нарушено дыхание или кровообращение. В ряде случаев успешно применяется терапия кислородом под высоким давлением; следует, однако, отметить, что интенсивная или продолжительная терапия кислородом под высоким давлением может вызвать кислородное отравление.

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ РАВНОВЕСИЕ, ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Изменение свободной энергии, характеризующее реакции окисления и восстановления, пропорционально способности реактантов отдавать или принимать электроны. Следовательно, изменение свободной энергии окислительно-восстановительного процесса можно характеризовать не только величиной $\Delta G^{\circ\prime}$ (см. гл. 11), но и величиной **окислительно-восстановительного потенциала** системы (E_0). Обычно окислительно-восстановительный потенциал системы (E_0) сравнивают с потенциалом водородного электрода, принимая последний за 0,0 В при pH 0. Однако для биологических систем удобнее использовать окислительно-восстановительный потенциал при pH 7,0 (E'_0); при таком pH потенциал водородного электрода равен −0,42 В. Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых систем,

Таблица 12.1. Стандартные потенциалы некоторых окислительно-восстановительных систем млекопитающих

Система	E'_0, вольт
Кислород/вода	+0,82
Цитохром *a*: Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,29
Цитохром *c*: Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,22
Убихинон: окисл./восстан.	+0,10
Цитохром *b*: Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,08
Фумарат/сукцинат	+0.03
Флавопротеин («желтый фермент»): окисл./восстан.	−0,12
Оксалоацетат/малат	−0,17
Пируват/лактат	−0,19
Ацетоацетат/β-гидроксибутират	−0,27
Липоат: окисл./восстан.	−0,29
NAD^+/NADH	−0,32
H^+/H_2	**−0,42**
Сукцинат/α-кетоглутарат	−0,67

представляющих особый интерес для физиологии млекопитающих, приведены в табл. 12.1. Пользуясь этой таблицей, можно предсказать, в каком направлении пойдет поток электронов при сопряжении одной окислительно-восстановительной системы с другой.

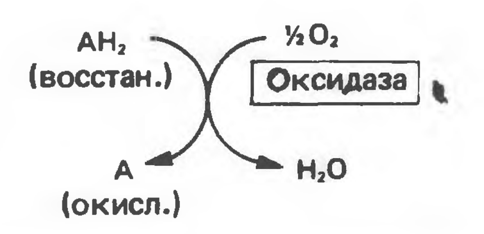


Рис. 12.1. Окисление метаболита, катализируемое оксидазой.

ФЕРМЕНТЫ И КОФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ

Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, называют **оксидоредуктазами**. Их разделяют на 5 групп.

1) **Оксидазы**. Истинные оксидазы катализируют удаление водорода из субстрата, используя при этом в качестве акцептора водорода только кислород[1]. Они неизменно содержат **медь**, продуктом реакции является вода (исключение составляют реакции, катализируемые уриказой и моноаминоксидазой, в результате которых образуется H_2O_2) (рис. 12.1).

2) **Аэробные дегидрогеназы** — ферменты, катализирующие удаление водорода из субстрата; в отличие от оксидаз они могут использовать в качестве акцептора водорода **не только кислород, но и искусственные акцепторы**, такие, как метиленовый синий. Эти дегидрогеназы относятся к **флавопротеинам**, и продуктом катализируемой ими реакции является перекись водорода, а не вода (рис. 12.2).

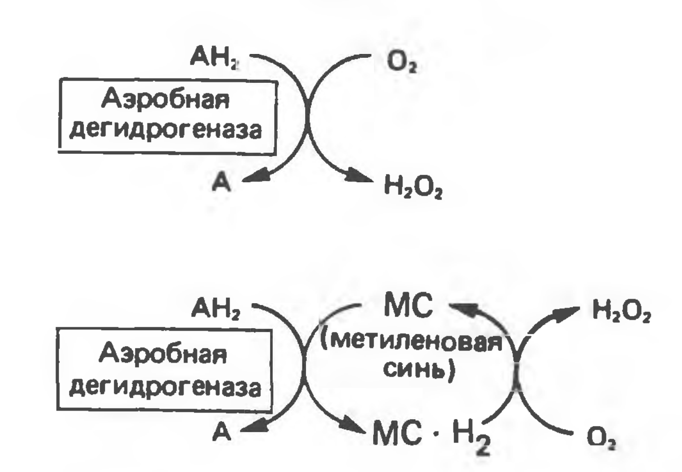


Рис. 12.2. Окисление метаболита, катализируемое аэробной дегидрогеназой.

3) **Анаэробные дегидрогеназы** — ферменты, катализирующие удаление водорода из субстрата, но **не способные использовать кислород** в качестве акцептора водорода. В этот класс входит большое число ферментов. Они выполняют две главные функции.

а. Перенос водорода с одного субстрата на другой в сопряженной окислительно-восстановительной реакции (рис. 12.3). Эти дегидрогеназы специфичны к субстратам, но часто используют один и тот же кофермент или переносчик водорода. Поскольку рассматриваемые реакции обратимы, они обеспечивают в клетке свободный перенос восстановительных эквивалентов. Реакции этого типа, приводящие к окислению одного субстрата за счет восстановления другого, особенно важны для осуществления окислительных процессов **в отсутствие кислорода**.

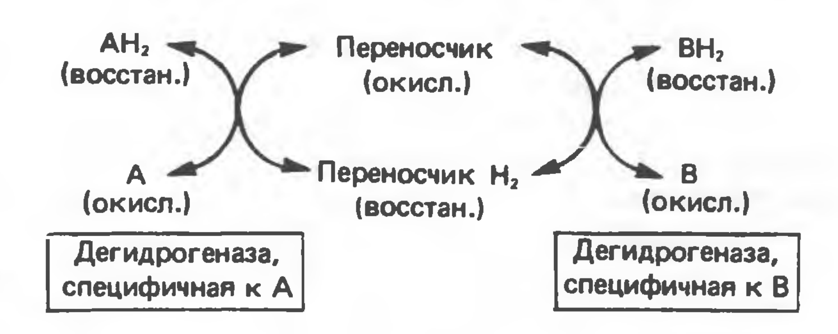


Рис. 12.3. Окисление метаболита, катализируемое анаэробными дегидрогеназами (без участия дыхательной цепи).

б. Функцию компонентов **дыхательной цепи**, обеспечивающих транспорт электронов от субстрата на кислород (рис. 12.4).

[1] Иногда «оксидазами» называют все ферменты, катализирующие реакции, идущие с участием молекулярного кислорода.

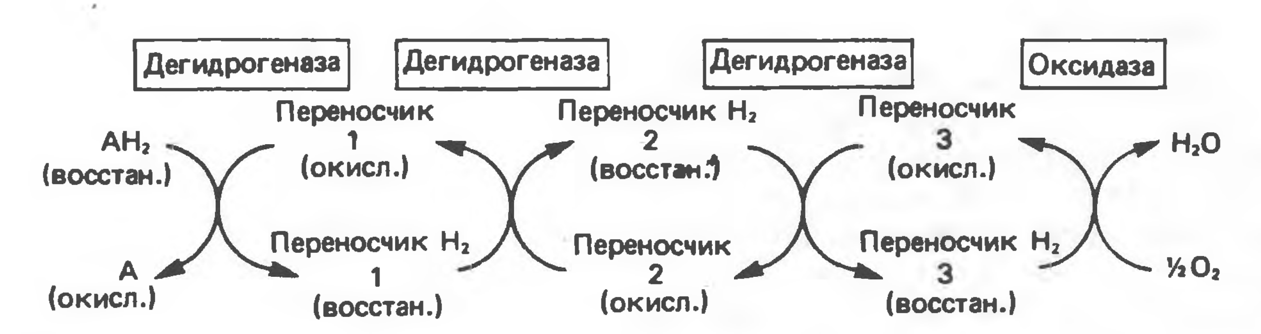


Рис. 12.4. Окисление метаболита анаэробными дегидрогеназами и — на завершающей стадии — истинной оксидазой дыхательной цепи.

4) **Гидроксипероксидазы** — ферменты, использующие в качестве субстрата перекись водорода или органические перекиси. К этой категории относятся два типа ферментов: **пероксидазы**, находящиеся в составе молока, в растениях, лейкоцитах, тромбоцитах, эритроцитах и т. д., и **каталаза**, функционирующая в тканях животных и растений.

5) **Оксигеназы** — ферменты, катализирующие прямое **введение кислорода** в молекулу субстрата.

Оксидазы

Цитохромоксидаза — гемопротеин, широко распространенный в растительных и животных тканях. Она служит конечным компонентом цепи дыхательных переносчиков, локализованных в митохондриях, и катализирует реакцию, в результате которой электроны, высвобождающиеся из молекул субстрата при их окислении дегидрогеназами, переносятся на конечный акцептор — кислород. Данный фермент отравляется окисью углерода, цианидом и сероводородом. Иногда цитохромоксидазу называют цитохромом a_3. Первоначально предполагали, что цитохром a и цитохром a_3 — это автономные гемопротеины, поскольку каждый из них характеризуется определенным спектром, кроме того, они проявляют разную чувствительность к действию окиси углерода и цианида. В дальнейшем же было показано, что эти два цитохрома входят в состав комплекса, который получил название цитохром aa_3. Он содержит две молекулы гема, в каждой из которых атом железа может переходить из состояния Fe^{2+} в состояние Fe^{3+} и обратно в ходе окисления и восстановления, а также два атома Cu, каждый из которых взаимодействует с одним из гемов.

Фенолаза (тирозиназа, полифенолоксидаза, катехолоксидаза) — это медьсодержащий фермент с широкой специфичностью. Он катализирует превращение монофенола (в присутствии *о*-дифенола) в *о*-хинон. Медь обнаружена в ряде других ферментов, в частности в **уриказе**, катализирующей окисление мочевой кислоты в аллантоин, и в **моноаминоксидазе**, окисляющей адреналин и тирамин в митохондриях.

Аэробные дегидрогеназы

Аэробные дегидрогеназы являются флавопротеинами; они содержат в качестве простетической группы **флавинмононуклеотид (FMN)** или **флавинаденин-динуклеотид (FAD). FMN и FAD образуются в организме человека из витамина рибофлавина** (рис. 12.5).

Рибофлавин (витамин B_2) в тканях млекопитающих не синтезируется; он образуется в растениях и микроорганизмах и является, следовательно, незаменимым компонентом диеты. В состав молекулы рибофлавина входят сахарный спирт **рибитол** и гетероциклический флавин. В тканях рибофлавин путем ATP-зависимого фосфорилирования превращается в FMN (рис. 12.6); далее путем переноса AMP от другой молекулы ATP образуется FAD (рис. 12.7).

Рис. 12.5. Рибофлавин.

FMN и FAD обычно прочно — но не ковалентно — связаны с соответствующим апоферментом. Многие флавопротеиновые ферменты содержат один или несколько ионов металлов, выполняющих роль кофакторов; такие флавопротеиновые ферменты называют **металлофлавопротеинами**.

К ферментам группы аэробных дегидрогеназ относится также дегидрогеназа L-аминокислот (оксидаза L-аминокислот) — находящийся в почках FMN-содержащий фермент с широкой специфичностью, катализирующий окислительное дезаминирование природных L-аминокислот. Широко распространена **ксантиндегидрогеназа** (ксантиноксидаза); она обнаружена в молоке, в тонком кишечнике, почках и печени. Ксантиндегидрогеназа содержит молибден; она играет важную роль в превращении пуриновых оснований в мочевую кислоту и особое значение имеет в печени и почках птиц, которые экскретируют мочевую кислоту как главный конечный азотсодержащий продукт метаболизма пуринов, а также катаболизма белков и аминокислот.

Рис. 12.6. Рибофлавинфосфат (флавинмононуклеотид, FMN).

Рис. 12.7. Флавинадениндинуклеотид (FAD).

Альдегиддегидрогеназа — FAD-содержащий фермент, находящийся в печени млекопитающих. Это — металлофлавопротеин, содержащий молибден и негемовое железо, окисляющий альдегиды и N-гетероциклические субстраты.

Глюкозооксидаза — FAD-специфичный фермент, получаемый из грибов. Она важна тем, что используется при определении глюкозы.

Механизм окисления и восстановления, осуществляемый этими ферментами, весьма сложен. Судя по имеющимся данным, происходит двустадийное восстановление изоаллоксазинового кольца с промежуточным образованием семихинона (свободного радикала) (рис. 12.8).

Анаэробные дегидрогеназы

А. Дегидрогеназы, зависимые от никотинамидных коферментов. В эту категорию попадает большое число дегидрогеназ. Они специфичны либо к никотинамидадениндинуклеотиду (NAD^+), либо к никотинамидадениндинуклеотидфосфату ($NADP^+$), выполняющим роль коферментов (рис. 12.9). Имеются, однако, дегидрогеназы, у которых коферментом может быть как NAD^+, так и $NADP^+$.

NAD^+ и $NADP^+$ образуются в организме человека из витамина ниацина. Ниацин включает **никотиновую кислоту** и ее амид (**никотинамид**) — каждое из этих соединений может выполнять функции витамина в пищевом рационе. Для синтеза NAD^+ или $NADP^+$ ферменты, находящиеся в цитозоле большинства клеток, используют только никотиновую кислоту, но не никотинамид. Никотинамидный фрагмент NAD^+ образуется из никотинатного фрагмента, когда последний находится в составе нуклеотида; амидная группа поступает из глутамина (рис. 12.9). Имеются данные о том, что в митохондриях для синтеза NAD^+ используется никотинамид. Коферменты восстанавливаются специфическими субстратами дегидрогеназ и окисляются адекватным акцептором электронов (рис. 12.10). Коферменты могут свободно и обратимо диссоциировать из комплекса с соответствующими апоферментами.

В общем случае **NAD-зависимые дегидрогеназы** катализируют окислительно-восстановительные реакции **окислительных путей метаболизма** — гликолиза, цикла лимонной кислоты, дыхательной цепи митохондрий. **NADP-зависимые дегидрогеназы** участвуют в процессах **восстановительного синтеза**, в частности во внемитохондриальном синтезе жирных кислот и стероидов; они также являются коферментами дегидрогеназ пентозофосфатного пути. Некоторые дегидрогеназы, функционирующие с никотинамидными коферментами, содержат ион цинка, в частности алкогольдегидрогеназа печени и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа скелетных мышц. Полагают, что ионы цинка не участвуют непосредственно в процессах окисления и восстановления.

Рис. 12.8. Восстановление изоаллоксазинового кольца флавиновых нуклеотидов.

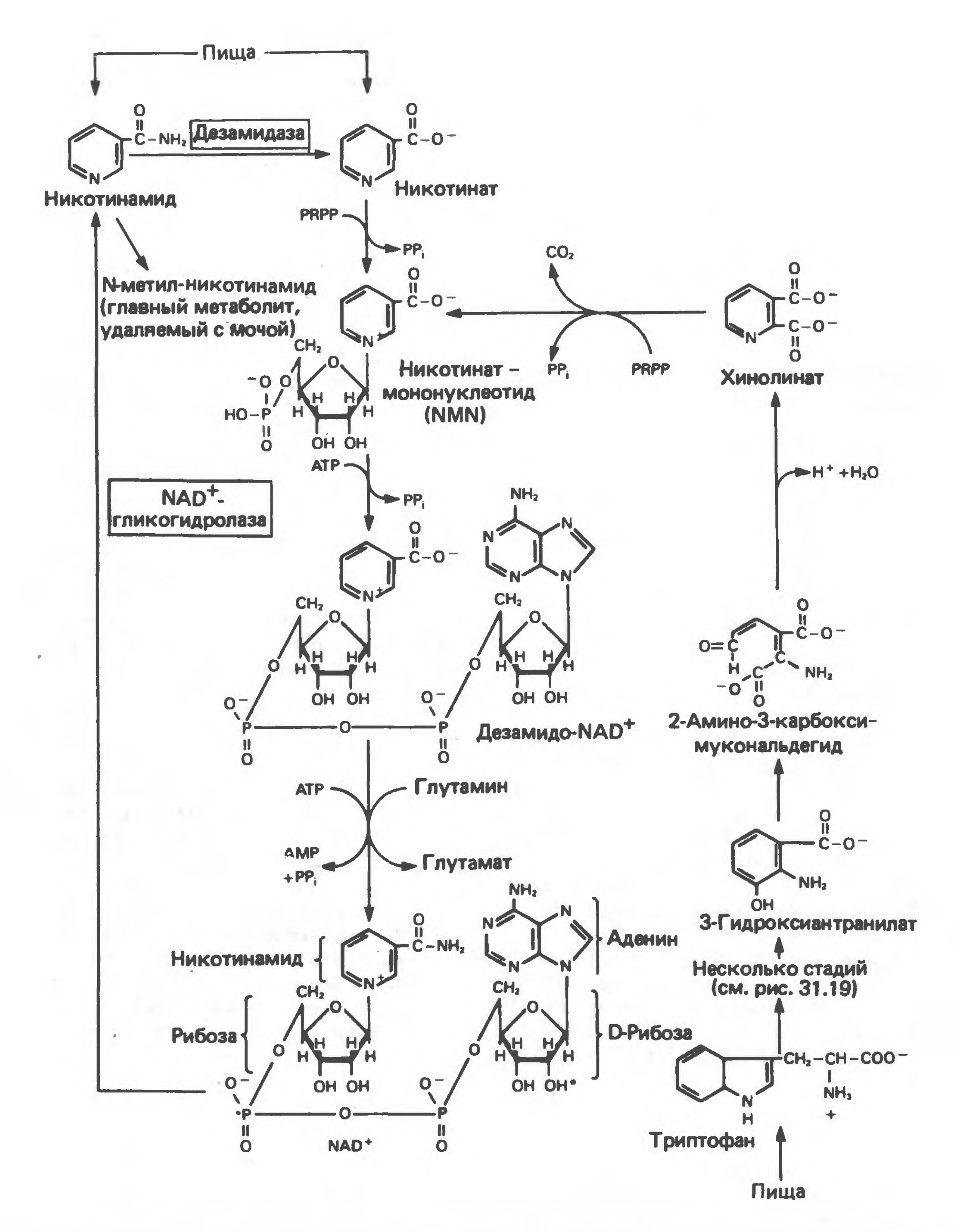


Рис. 12.9. Синтез и распад никотинамидадениндинуклеотида (NAD). Фосфорилирована 2′-гидроксильная группа (отмечено звездочкой) аденозинового фрагмента молекулы никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($NADP^+$). У человека в отличие, например, от кошки потребность в ниацине может быть обеспечена за счет триптофана при достаточном количестве его в диете. В норме за счет триптофана синтезируется примерно две трети имеющегося в организме ниацина. PRPP — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат.

Дегидрогеназа, специфичная к А

AH_2

А-форма

$A + H^+$

AH_2

Дегидрогеназа, специфичная к В

В-форма

$$NAD^+ + AH_2 \longleftrightarrow NADH + H^+ + A$$

Рис. 12.10. Механизм окисления и восстановления никотинамидных коферментов. Восстановление никотинамида субстратом (AH_2) по положению 4 происходит стереоспецифически. Один из атомов водорода переносится от субстрата в положение 4 в виде ядра водорода с двумя электронами (гидрид-ион, H^-); он может присоединиться либо в А-, либо в В-положении в зависимости от специфичности дегидрогеназы, катализирующей данную реакцию. Другой водород, отщепляемый от субстрата, остается свободным в виде иона водорода.

Б. Рибофлавинзависимые дегидрогеназы. Флавиновые группы этих дегидрогеназ те же, что и у аэробных дегидрогеназ, FMN и FAD. Обычно они более прочно, чем никотинамидные коферменты, связаны с апоферментом. Большинство рибофлавинзависимых анаэробных дегидрогеназ либо участвует в транспорте электронов по дыхательной цепи, либо поставляет электроны для этой цепи. **NADH-дегидрогеназа** — компонент дыхательной цепи, переносящий электроны от NADH к более электроположительным компонентам. Другие дегидрогеназы, например **сукцинатдегидрогеназа, ацил-СоА-дегидрогеназа** и **митохондриальная глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа**, переносят восстановительные эквиваленты от субстрата непосредственно на дыхательную цепь. Еще одна функция флавинзависимых дегидрогеназ — катализируемое дигидролипоилдегидрогеназой дегидрирование восстановленного липоата (интермедиата при окислительном декарбоксилировании пирувата и α-кетоглутарата) (см. рис. 18.5). В этом случае вследствие низкого значения окислительно-восстановительного потенциала системы липоата переносчиком водорода от восстановленного липоата к NAD^+ является флавопротеин (FAD). **Электронпереносящий флавопротеин** является промежуточным переносчиком электронов между ацил-СоА-дегидрогеназой и дыхательной цепью (см. рис. 13.3).

В. Цитохромы. За исключением рассмотренной выше цитохромоксидазы, цитохромы классифицируются как анаэробные дегидрогеназы. Их идентификация и изучение облегчаются тем обстоятельством, что в восстановленном состоянии они имеют характерные полосы в спектре поглощения, которые исчезают при окислении. В дыхательной цепи они служат **переносчиками электронов от флавопротеинов к цитохромоксидазе**. Цитохромы являются железосодержащими гемопротеинами, у которых атом железа переходит из состояния Fe^{2+} в Fe^{3+} и обратно в процессе окисления и восстановления. В состав дыхательной цепи входят цитохромы *b*, c_1, *c*, *a* и a_3 (цитохромоксидаза). Из них растворимым является только цитохром *c*. Помимо дыхательной цепи цитохромы имеются в эндоплазматическом ретикулуме (цитохромы Р-450 и b_5), в растительных клетках, бактериях и дрожжах.

Гидропероксидазы

А. Пероксидаза. Первоначально пероксидазы считались растительными ферментами, позднее они были обнаружены также в молоке, лейкоцитах, тромбоцитах, а также в тканях, в которых происходит метаболизм эйкозаноидов (см. с. 333). Простетической группой является протогем, который в отличие от гемовых групп большинства гемопротеинов весьма слабо связан с апоферментом. В реакции, катализируемой пероксидазой, перекись водорода восстанавливается за счет соединений, выступающих в качестве доноров электронов, таких, как аскорбат, хиноны или цитохром *c*. Реакция, катализируемая пероксидазой, имеет сложный характер; суммарная реакция выглядит следующим образом:

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} 2H_2O + A$$

В эритроцитах **глутатионпероксидаза**, содержащая в качестве простетической группы **селен**, катализирует разложение H_2O_2 и гидроперекисей липидов восстановленным глутатионом и таким образом защищает липиды мембран и гемоглобин от окисления перекисями.

Б. Каталаза. Это — гемопротеин, содержащий четыре гемовые группы. Наряду с пероксидазной активностью каталаза способна использовать одну молекулу H_2O_2 в качестве донора электронов, а другую — как окислитель, т. е. акцептор электронов. In vivo в большинстве случаев каталаза разлагает пероксид водорода

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Каталаза}} 2H_2O + O_2$$

Каталаза имеется в крови, костном мозге, мембранах слизистых оболочек, почках и печени. Ее функцией считается **разложение перекиси водорода**, образующейся при действии аэробных дегидрогеназ. Во многих тканях, включая и печень, обнаружены микротельца, **пероксисомы**, которые богаты аэробными дегидрогеназами и каталазой. По-видимому, биологически выгодно группировать в одном месте как ферменты, приводящие к образованию H_2O_2, так и ферменты, разлагающие ее (рис. 12.11). К ферментам, обеспечивающим образование H_2O_2, помимо пероксисомных ферментов относятся также митохондриальные и микросомные системы транспорта электронов.

Оксигеназы

Оксигеназы не относятся к ферментам, катализирующим реакции, снабжающие клетку энергией; они участвуют в синтезе и деградации многих типов метаболитов. Ферменты этой группы катализируют включение кислорода в молекулу субстрата. Оно происходит в две стадии: 1) кислород связывается с активным центром фермента; 2) происходит реакция, в результате которой связанный кислород восстанавливается или переносится на субстрат. Оксигеназы подразделяются на две подгруппы.

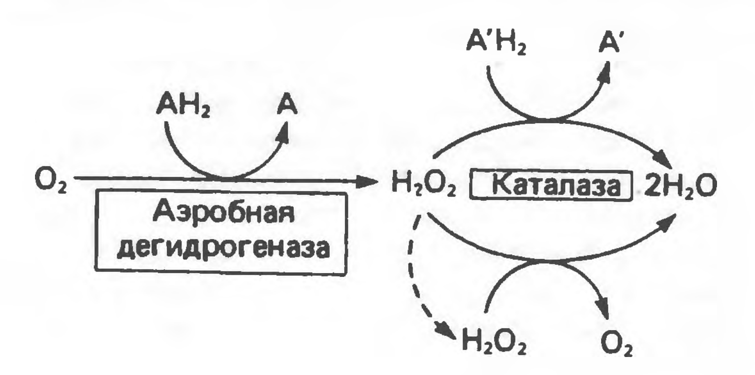
А. Диоксигеназы (кислород-трансферазы, истинные оксигеназы). Эти ферменты катализируют включение в молекулу субстрата обоих атомов молекулы кислорода:

$$A + O_2 \longrightarrow AO_2.$$

Примером служат железосодержащие ферменты **гомогентизатдиоксигеназа** и **3-гидроксиантранилат-диоксигеназа** из супернатантной фракции гомогената печени, а также гемсодержащие ферменты, в частности **L-триптофандиоксигеназа** (триптофанпирролаза) из печени.

Б. Монооксигеназы (оксидазы со смешанной функцией, гидроксилазы). Эти ферменты катализируют включение в субстрат только одного из атомов молекулы кислорода. Другой атом кислорода восстанавливается до воды; для этой цели необходим дополнительный донор электронов (косубстрат):

$$A—H + O_2 + ZH_2 \longrightarrow A—OH + H_2O + Z$$



Микросомные цитохром Р-450-содержащие монооксигеназные системы

К этой группе относятся ферменты, участвующие в метаболизме многих лекарственных веществ путем их гидроксилирования. Они находятся в микросомах печени вместе с цитохромом Р-450 и цитохромом b_5. Восстановителями этих цитохромов являются NADH и NADPH (рис. 12.12); цитохромы окисляются субстратами в результате серии ферментативных реакций, составляющих так называемый гидроксилазный цикл (рис. 12.13):

$$\text{Лек—H} + O_2 + \underset{(\text{P-450})}{2Fe^{2+}} + 2H^+ \xrightarrow{\text{Гидроксилаза}}$$

$$\rightarrow \text{Лек—OH} + H_2O + \underset{(\text{P-450})}{2Fe^{3+}}$$

(Лек — лекарственное вещество).
К лекарственным веществам, метаболизм которых идет при участии рассматриваемых систем, относятся бензпирен, аминопирин, анилин, морфин и бензофетамин. Многие лекарственные вещества, например фенобарбитал, способны индуцировать синтез микросомных ферментов и цитохрома Р-450.

Митохондриальные цитохром Р-450-содержащие монооксигеназные системы

Эти системы находятся в стероидогенных тканях — в коре надпочечников, в семенниках, яичниках и плаценте; они участвуют в биосинтезе стероидных гормонов из холестерола (гидроксилирование по C_{22} и C_{20} при отщеплении боковой цепи и по положениям 11β и 18). Ферменты почечной системы катализируют гидроксилирование 25-гидроксихолекальциферола по

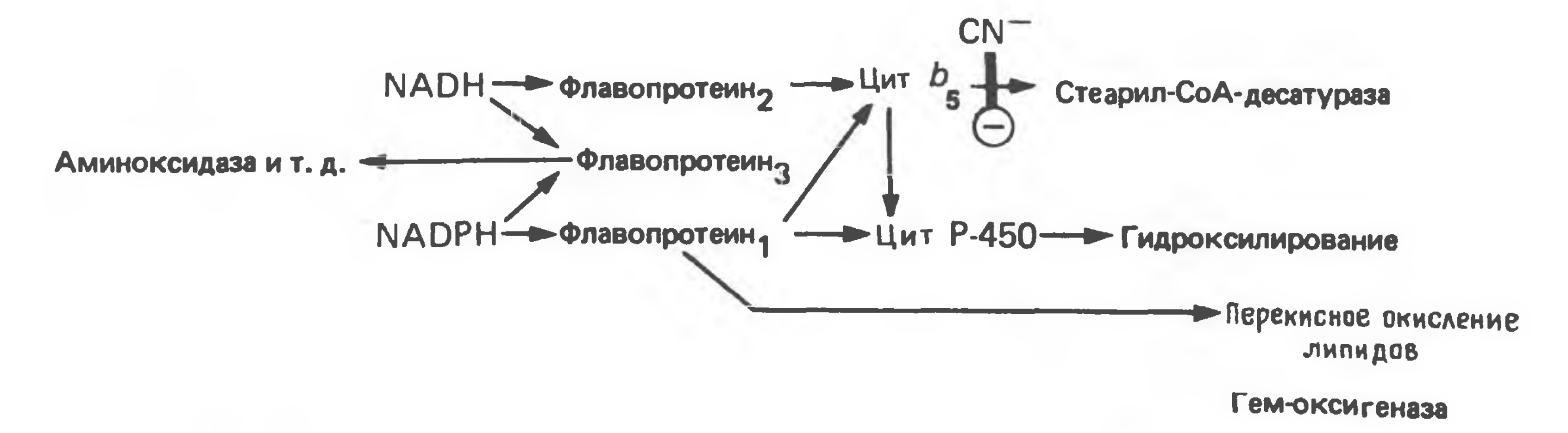


Рис. 12.12. Цепь транспорта электронов в микросомах. Цианид (CN^-) ингибирует стадию, указанную на рисунке.

положениям 1α и 24; в печени происходит гидроксилирование холестерола по положению 26 при биосинтезе желчных кислот. В коре надпочечников содержание митохондриального цитохрома Р-450 в шесть раз выше, чем содержание цитохромов дыхательной цепи. Монооксигеназная система состоит из трех компонентов, локализованных во внутренней митохондриальной мембране на границе с матриксом: NADP-специфичного FAD-содержащего флавопротеина, Fe_2S_2-белка (адренодоксина) и цитохрома Р-450 (рис. 12.14).

Метаболизм супероксид-радикала

Кислород является потенциально токсичным веществом. До недавнего времени его токсичность связывали с образованием H_2O_2. Однако в последнее время, принимая во внимание, во-первых, то обстоятельство, что кислород в тканях легко восстанавливается в супероксидный анион-радикал (O_2^-), и, во-вторых, наличие у аэробных организмов **супероксиддисмутазы** (ее нет у облигатных анаэробов), было выдвинуто предположение о том, что токсичность кислорода обусловлена его превращением в супероксид. Однако прямых данных о токсичности супероксид-радикала пока не получено.

Супероксид образуется в ходе одноэлектронного окисления молекулярным кислородом восстановленного флавина, например флавина в составе ксантиндегидрогеназы. Он образуется также при одноэлектронном окислении молекулярным кислородом восстановленного компонента дыхательной цепи:

$$\text{Enz—H}_2 + O_2 \longrightarrow \text{Enz—H} + O_2^- + H^+.$$

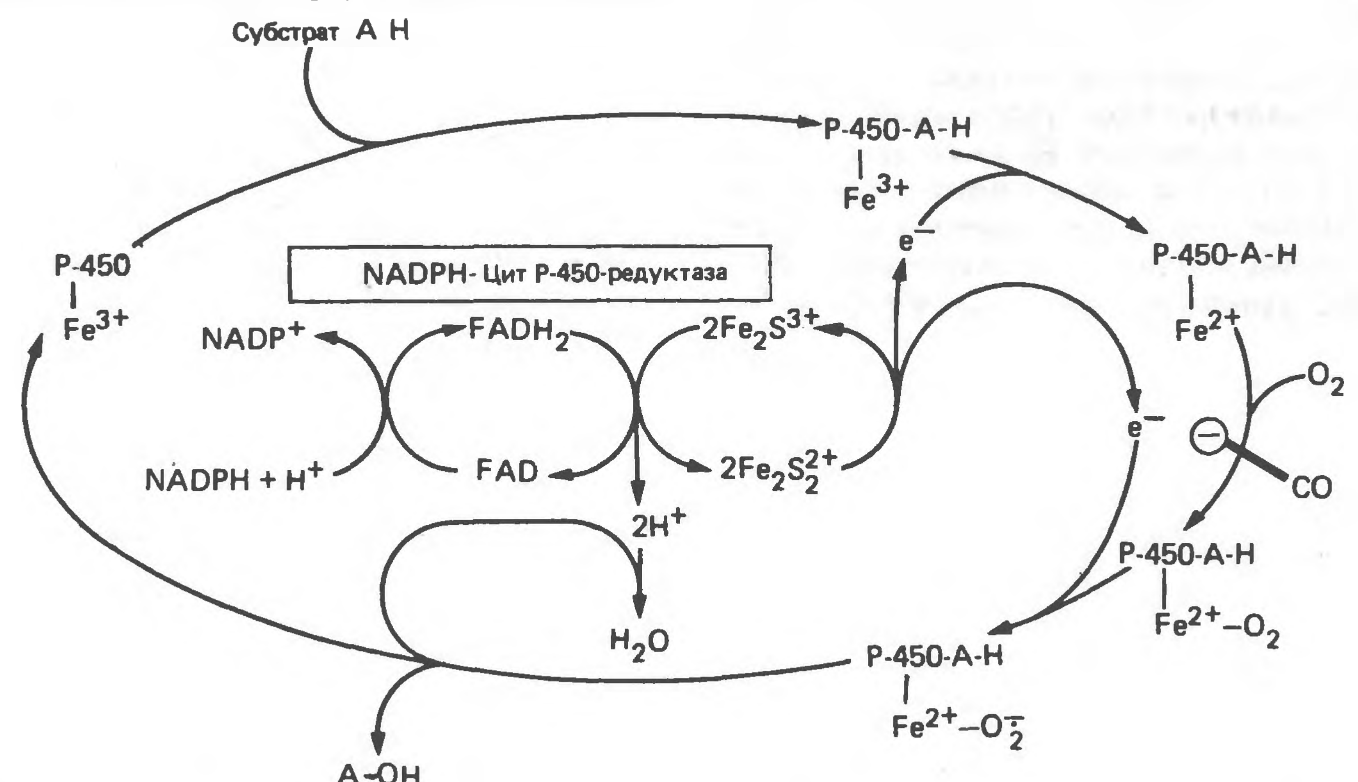


Рис. 12.13. Цитохром Р-450-гидроксилазный цикл в микросомах. Приведенная система типична для гидроксилаз стероидов в коре надпочечников. Микросомная цитохром Р-450-гидроксилаза печени не нуждается в присутствии железо-серного белка Fe_2S_2. Окись углерода (CO) ингибирует указанную на рисунке стадию.

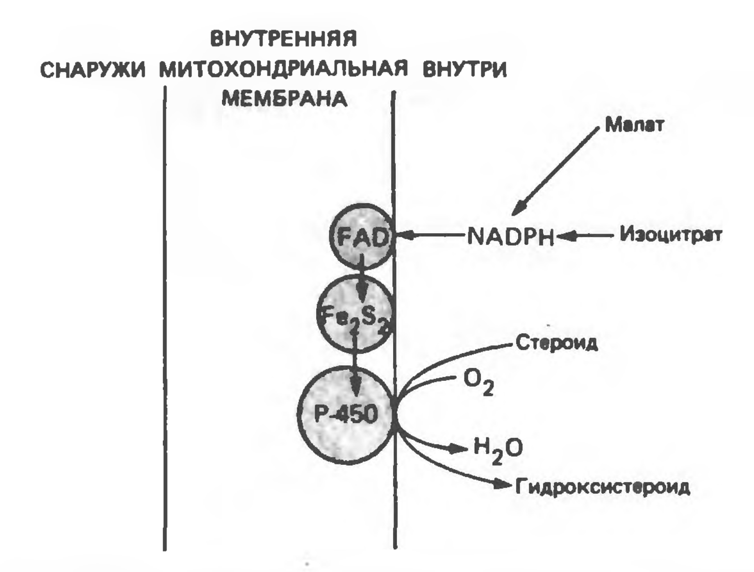


Рис. 12.14. Митохондриальная цитохром Р-450-монооксигеназная система. Fe_2S_2 — железо-серный белок (адренодоксин). Поскольку NADP(H) не может проникать в митохондриальную мембрану, источниками восстановительных эквивалентов являются такие субстраты, как малат и изоцитрат, для которых внутри митохондрий имеются специфические NADP-зависимые дегидрогеназы.

Супероксид может восстанавливать окисленный цитохром *c*:

$$O_2^{\overline{\cdot}} + \text{Цит}\,c(Fe^{3+}) \longrightarrow O_2 + \text{Цит}\,c(Fe^{2+}).$$

Он удаляется также специфическим ферментом — супероксиддисмутазой:

$$O_2^{\overline{\cdot}} + O_2^{\overline{\cdot}} + 2H^+ \xrightarrow{\text{Супероксид-дисмутаза}} H_2O_2 + O_2$$

В этой реакции супероксид выступает одновременно как окислитель и как восстановитель. Химическое действие супероксида в тканях усиливается в результате инициирования цепной реакции образования свободных радикалов. Было высказано предположение, что $O_2^{\overline{\cdot}}$, связанный с цитохромом Р-450, является интермедиатом при активации кислорода в процессе реакций гидроксилирования (рис. 12.13).

Функцией супероксиддисмутазы является, по-видимому, защита аэробных организмов от повреждающего действия супероксида. Фермент обнаруживается в нескольких внутриклеточных компартментах. Цитозольный фермент состоит из двух сходных субъединиц, содержащих по одному иону Cu^{2+} и Zn^{2+}; митохондриальный фермент, так же как и фермент, обнаруженный у бактерий, содержит ион Mn^{2+}. Это обстоятельство служит еще одним свидетельством в пользу гипотезы о происхождении митохондрий из прокариот, вступивших в симбиоз с протоэукариотами. Дисмутаза присутствует во всех основных тканях аэробов. Пребывание животных в атмосфере 100%-ного кислорода вызывает адаптивное повышение содержания дисмутазы, особенно в легких; длительное пребывание в такой атмосфере приводит к повреждению легких и летальному исходу. Антиоксиданты, например α-токоферол (витамин Е), способны улавливать свободные радикалы, такие, как $O_2^{\overline{\cdot}}$, снижая тем самым токсичность кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

Bonnett R. Oxygen activation and tetrapyrroles, Essays Biochem., 1981, **17**, 1.

Ernster L. (ed.) Bioenergetics, Elsevier, 1984.

Fleisher S., Packer L. (ed.) Biological oxidations, microsomal, cytochrome P-450, and other hemoprotein systems. In: Methods in Enzymology, Vol. 52, Biomembranes, part C, Academic Press, 1978.

Friedovich I. Superoxide dismutases, Annu. Rev. Biochem., 1975, **44**, 147.

Salemme F. R. Structure and function of cytochromes c, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 299.

Schenkman J. B., Jansson I., Robie-Suh K. M. The many roles of cytochrome b_5 in hepatic microsomes, Life Sci., 1976, **19**, 611.

Tolbert N. E. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes, Annu. Rev. Biochem., 1981, **50**, 133.

Tyler D. D., Sutton C. M. Respiratory enzyme systems in mitochondrial membranes, Page 33. In: Membrane Structure and Function, Vol. 5, Bittar E. E. (ed.), Wiley, 1984.

White R. E., Coon M. J. Oxygen activation by cytochrome P-450, Annu. Rev. Biochem., 1980, **49**, 315.

Глава 13

Окислительное фосфорилирование и транспортные системы митохондрий

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии справедливо называют «энергетическими станциями» клетки, поскольку именно в этих органеллах в основном происходит улавливание энергии, поставляемой окислительными процессами. Митохондриальную систему сопряжения окислительных процессов с генерацией высокоэнергетического интермедиата ATP называют окислительным фосфорилированием.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Окислительное фосфорилирование позволяет аэробным организмам улавливать значительную долю потенциальной свободной энергии окисления субстратов. Возможное объяснение механизма окислительного фосфорилирования предлагает хемиосмотическая теория. Ряд лекарственных веществ (например, амобарбитал) и ядов (цианид, окись углерода) подавляют окислительное фосфорилирование, обычно с фатальными последствиями. Окислительное фосфорилирование является столь жизненно важным процессом, что нарушение его нормального хода несовместимо в жизнью. Этим можно объяснить, почему обнаружено лишь небольшое число генетических нарушений, затрагивающих эту систему.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ

Вся полезная энергия, высвобождаемая в процессе окисления жирных кислот и аминокислот, и почти вся энергия окисления углеводов используется в митохондриях в форме восстановительных эквивалентов (—Н или электронов). Митохондрии содержат несколько катализаторов, образующих дыхательную цепь, которые обеспечивают улавливание и перенос восстановительных эквивалентов, направляя их на реакцию с кислородом, приводящую к образованию воды. Одновременно функционирует механизм улавливания потенциальной свободной энергии с накоплением ее в форме высокоэнергетических фосфатов. Митохондрии содержат также ферментные системы, обеспечивающие образование большинства восстановительных эквивалентов; это ферменты β-окисления и цикла лимонной кислоты (последний является общим метаболическим путем при окислении всех основных пищевых продуктов). Эти взаимоотношения показаны на рис. 13.1.

ОРГАНИЗАЦИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В МИТОХОНДРИЯХ

Главные компоненты дыхательной цепи (рис. 13.2) приведены последовательно в порядке возрастания окислительно-восстановительного потенциала в табл. 12.1. Атомы водорода или электроны перемещаются по цепи **от более электроотрицательных компонентов к более электроположительному кислороду**, изменение окислительно-восстановительного потенциала при переходе от системы $NAD^+/NADH$ к системе O_2/H_2O составляет 1,1 В.

Главная дыхательная цепь в митохондриях начинается от NAD-зависимых дегидрогеназ, проходит через флавопротеины и цитохромы и заканчивается молекулярным кислородом. Не все субстраты связаны с дыхательной цепью через NAD-зависимые дегидрогеназы; некоторые из них, имеющие относительно высокий окислительно-восстановительный потенциал (например, система фумарат/сукцинат, см. табл. 12.1), связаны с флавопротеиновыми дегидрогеназами, которые в свою очередь связаны с цитохромами дыхательной цепи (рис. 13.3).

В последнее время установлено, что в дыхательной цепи имеется еще один переносчик, связывающий флавопротеины с цитохромом *b*, обладающим самым низким среди цитохромов окислительно-восстановительным потенциалом. Этот переносчик, названный **убихиноном** или **коферментом Q** (рис. 13.4), в аэробных условиях находится в митохондриях в форме окисленного хинона, а в анаэробных условиях — в восстановленной хинольной форме. Кофермент Q является компонентом митохондриальных липидов; среди других липидов преобладают

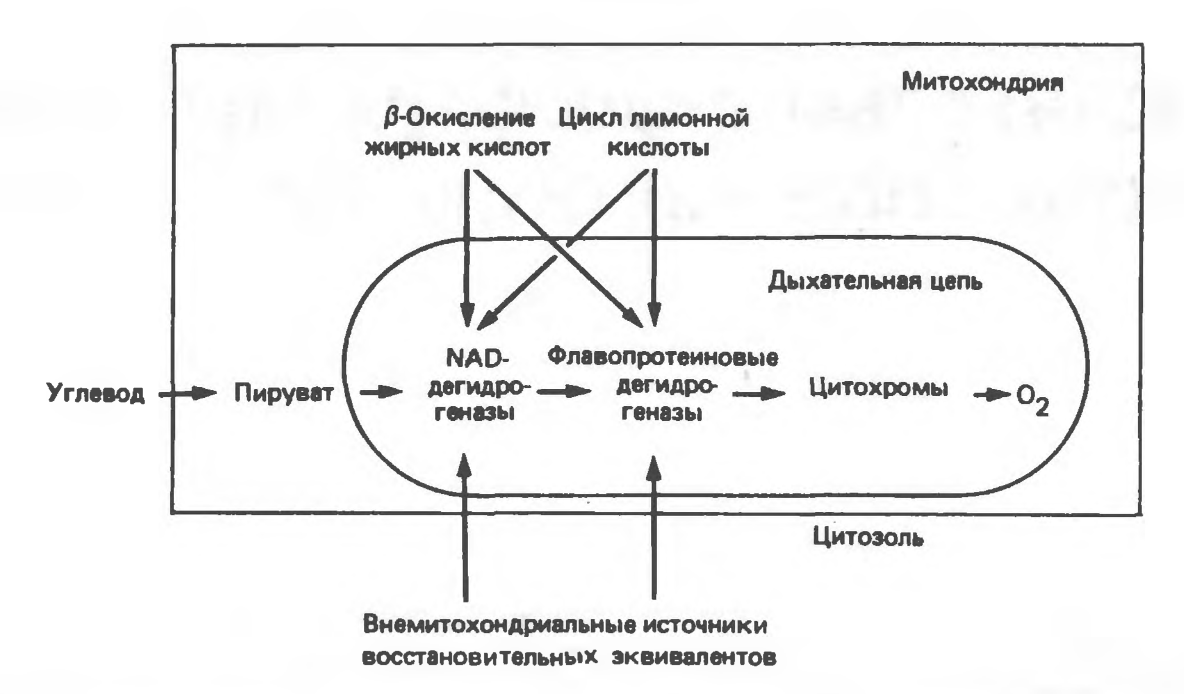


Рис. 13.1. Главные источники восстановительных эквивалентов и их связь с митохондриальной дыхательной цепью. Основным внемитохондриальным источником является NADH, который образуется в ходе гликолиза.

фосфолипиды, являющиеся частью митохондриальной мембраны. Структура кофермента Q сходна со структурой витаминов K и E. Близкую структуру имеет и пластохинон, находящийся в хлоропластах. Все эти вещества имеют в своей структуре полиизопреноидную боковую цепь. Содержание кофермента Q значительно превосходит содержание других компонентов дыхательной цепи (по параметру стехиометрии); это позволяет предположить, что кофермент Q является подвижным компонентом дыхательной цепи, который получает восстановительные эквиваленты от фиксированных флавопротеиновых комплексов и передает их на цитохромы.

Дополнительным компонентом, находящимся в функционально активных препаратах дыхательной цепи, является **железо-серный белок, FeS** (негемовое железо). Он ассоциирован с флавопротеинами (металлофлавопротеинами) и с цитохромом *b*. Железо и сера, как полагают, участвуют в окислительно-восстановительном процессе, протекающем по одноэлектронному механизму (рис. 13.5).

Современные представления о последовательности главных компонентов дыхательной цепи отражены на рис. 13.3. На электроотрицательном конце цепи дегидрогеназы катализируют перенос электронов от субстратов на NAD, находящийся в дыхательной цепи. Это происходит по двум путям. В тех случаях, когда субстратами служат α-кетокислоты, пируват и кетоглутарат, в переносе электронов на NAD участвуют сложные дегидрогеназные системы, содержащие липоат и FAD. Перенос электронов другими дегидрогеназами, использующими в качестве субстратов L(+)-3-гидроксиацил-CoA, D(−)-3-гидроксибутират, пролин, глутамат, малат и изоцитрат, происходит прямо на NAD дыхательной цепи.

Восстановленный NADH в дыхательной цепи в свою очередь окисляется металлофлавопротеином **NADH-дегидрогеназой**. Этот фермент содержит FeS и FMN и прочно связан с дыхательной цепью. Кофермент Q служит коллектором восстановительных эквивалентов, которые поставляются рядом субстратов через флавопротеиновые дегидрогеназы в дыхательную цепь. К числу этих субстратов относятся сукцинат, холин, глицерол-3-фосфат, саркозин, диметилглицин и ацил-CoA (рис. 13.3). Флавиновым компонентом этих дегидрогеназ является, по-видимому, FAD. Поток электронов от кофермента Q далее идет через ряд цитохромов к молекулярному кислороду (рис. 13.3). Цитохромы выстроены в порядке возрастания окислительно-вос-

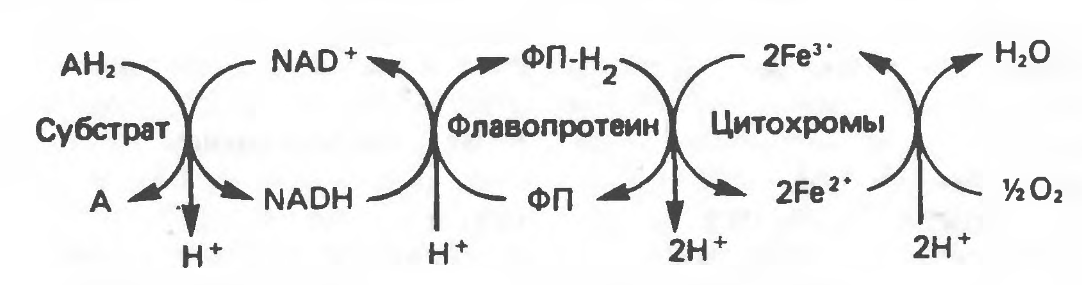


Рис. 13.2. Транспорт восстановительных эквивалентов по дыхательной цепи.

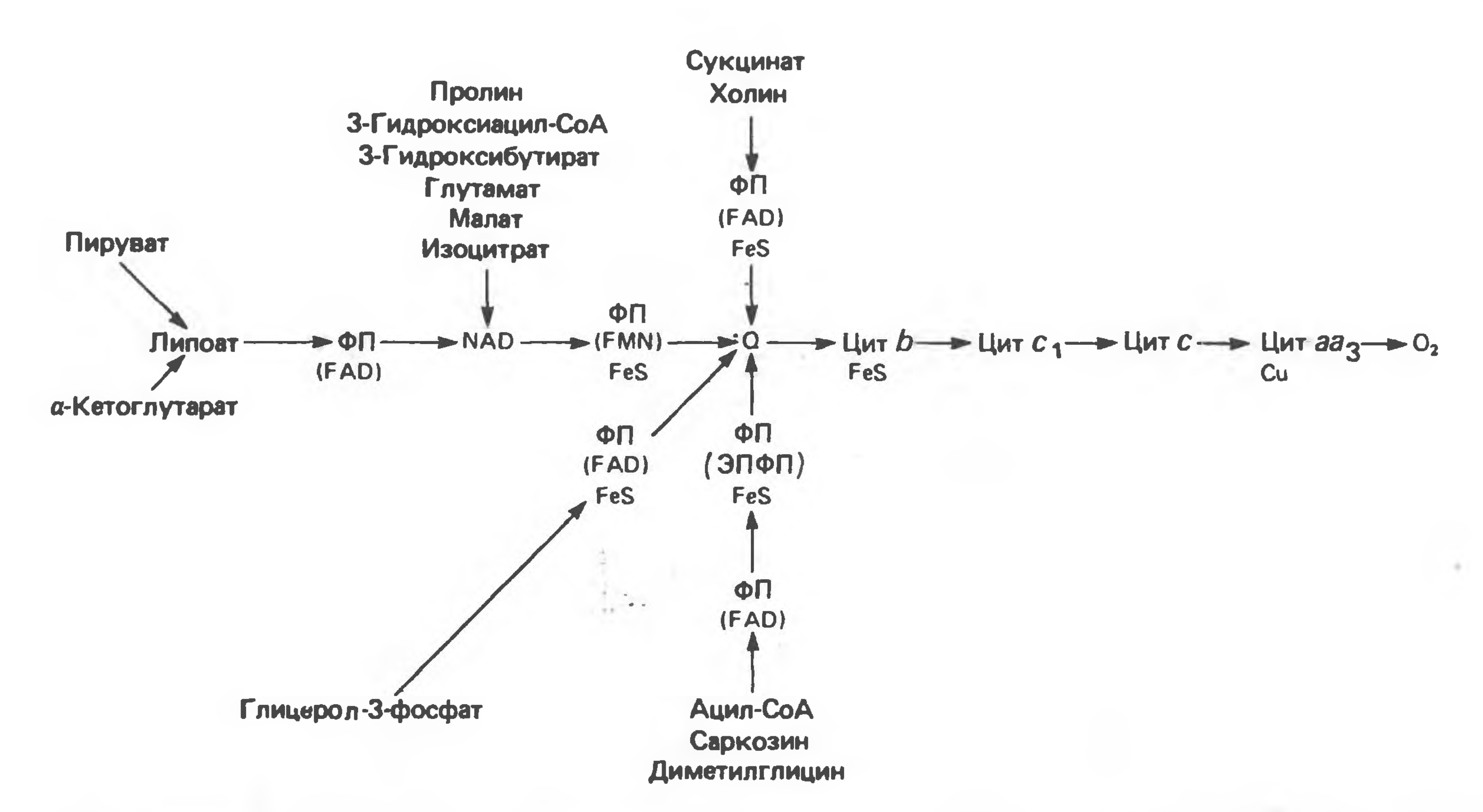


Рис. 13.3. Компоненты дыхательной цепи митохондрий. FeS находится в цепи «на O_2-стороне» ФП или Цит *b*. Цит — цитохром; ЭПФП — электронпереносящий флавопротеин; FeS — железо-серный белок; ФП — флавопротеин; Q — убихинон.

Рис. 13.4. Структура убихинона (Q); n — число изопреноидных звеньев, варьирующее от 6 до 10, т. е. Q_{6-10}.

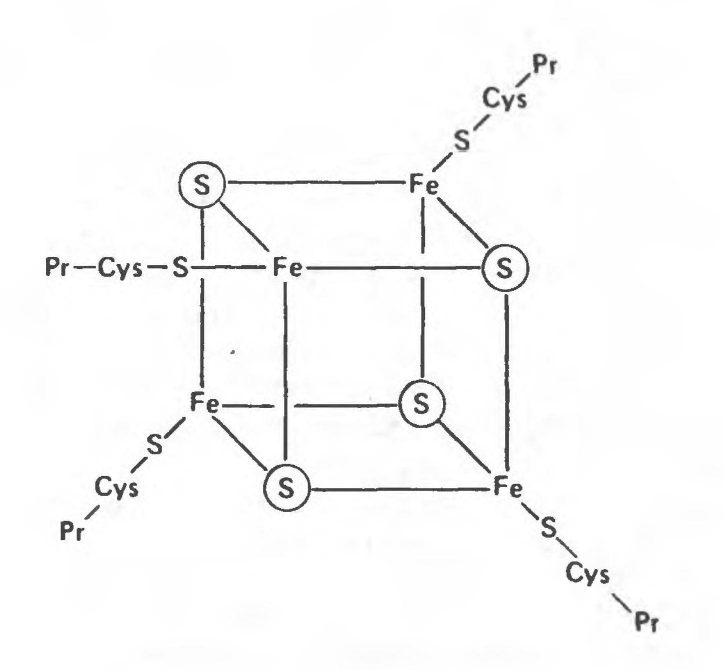


Рис. 13.5. Железо-серный центр (Fe_4S_4) железо-серного белка. S — кислотолабильная сера; Pr — апобелок; Cys — остаток цистеина. Некоторые железо-серные белки содержат 2 атома железа и 2 атома серы (Fe_2S_2).

становительного потенциала. Терминальный цитохром aa_3 (цитохромоксидаза) осуществляет конечную стадию процесса — перенос восстановительных эквивалентов на молекулярный кислород. Как уже упоминалось, эта ферментная система содержит медь — непременный компонент истинных оксидаз. Цитохромоксидаза имеет очень высокое сродство к кислороду, что позволяет дыхательной цепи функционировать с максимальной скоростью до тех пор, пока в ткани не будет практически исчерпан O_2. Эта катализируемая цитохромоксидазой реакция является необратимой; она определяет направление движения восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи, с которым сопряжено образование ATP.

В отношении структурной организации дыхательной цепи был выдвинут ряд предположений. Существенно то, что молярные соотношения между компонентами являются почти постоянными. Функционирующие компоненты дыхательной цепи встроены во внутреннюю митохондриальную мем-

5 1573

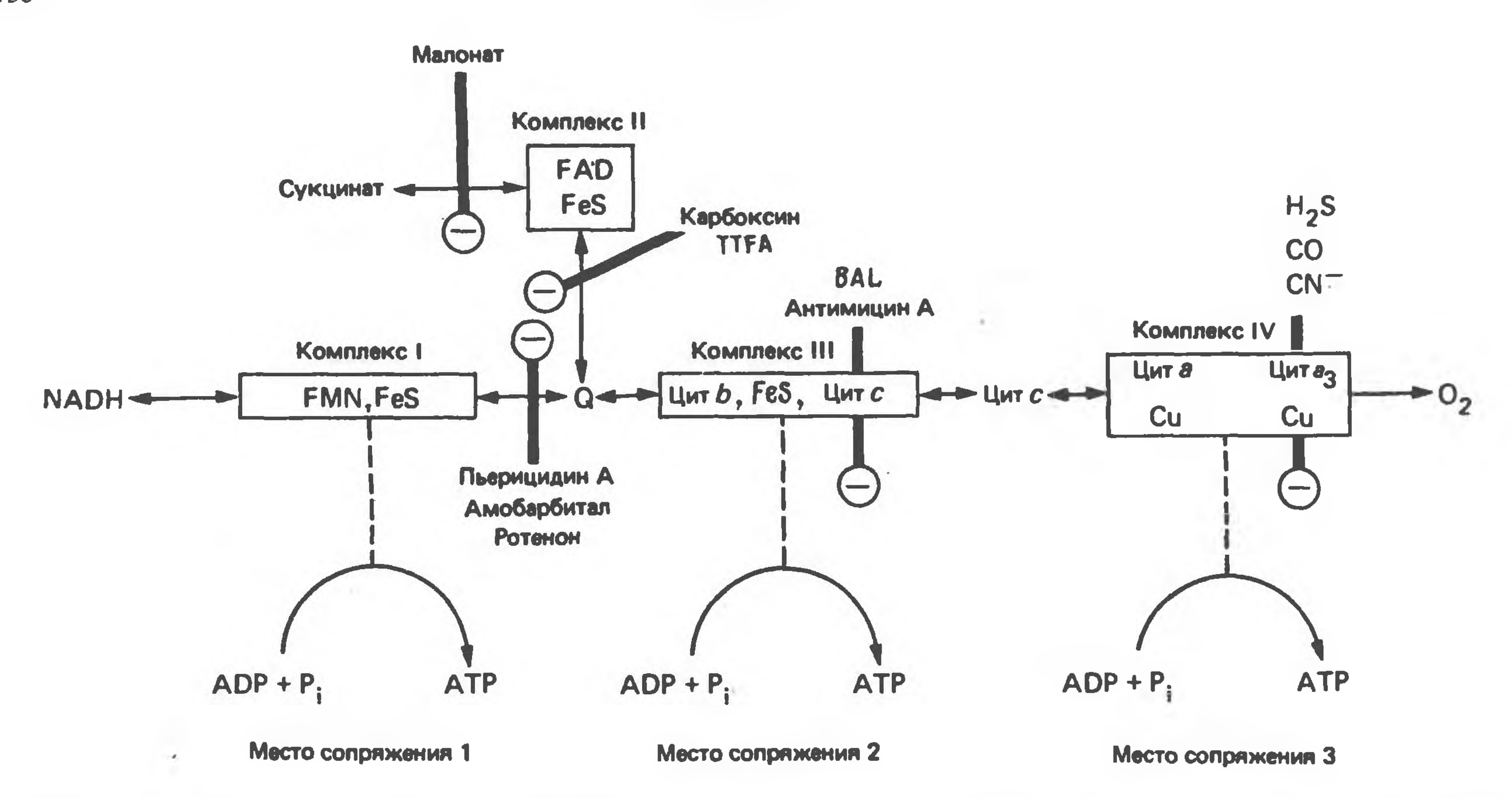


Рис. 13.6. Предполагаемые участки ингибирования (⊖) дыхательной цепи специфическими лекарственными веществами, химическими реагентами и антибиотиками. Указаны участки, где предположительно происходит сопряжение с фосфорилированием. BAL — димеркапрол; TTFA — хелатобразующий реагент на железо. Комплекс I — NADH: убихинон-оксидоредуктаза; комплекс II — сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза; комплекс III — убихинол: феррицитохром *c*-оксидоредуктаза; комплекс IV — ферроцитохром *c*: кислород-оксидоредуктаза. Другие сокращения — такие же, как и на рис. 13.3.

брану в виде четырех белково-липидных **комплексов дыхательной цепи**. На этом основании был сделан вывод об определенной пространственной ориентации этих комплексов в мембране. Цитохром *c* является единственным растворимым цитохромом и наряду с коферментом Q служит относительно мобильным компонентом дыхательной цепи, осуществляющим связь между фиксированными в пространстве комплексами (рис. 13.6).

РОЛЬ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В УЛАВЛИВАНИИ ЭНЕРГИИ

Молекулой, улавливающей часть свободной энергии, высвобождаемой в катаболических процессах, **в виде высокоэнергетических фосфатов служит ADP**. Образующийся в результате **ATP** поставляет затем свободную энергию далее для осуществления энергозависимых процессов. Поэтому ATP можно назвать **энергетической «валютой»** клетки (см. рис. 11.8).

За счет гликолиза образуются две высокоэнергетические фосфатные группы; их энергия равна примерно 61 кДж·моль$^{-1}$ глюкозы (см. табл. 18.1). Поскольку при полном сгорании глюкозы выделяется примерно 2780 кДж, доля энергии, улавливаемой в ходе гликолиза путем фосфорилирования, весьма невелика. Реакции цикла лимонной кислоты, которыми завершается процесс полного окисления глюкозы, включают еще одну стадию фосфорилирования; она сопровождает превращение сукцинил-CoA в сукцинат, что обеспечивает образование еще двух высокоэнергетических фосфатов на 1 моль глюкозы. Все рассмотренные выше реакции фосфорилирования происходят **на субстратном уровне**. Оценка эффективности улавливания энергии интактными митохондриями показывает, что при окислении субстратов, идущем с участием NAD-зависимых дегидрогеназ и дыхательной цепи, происходит включение 3 молей неорганического фосфата в ADP и образуется 3 моля ATP на 1/2 моля потребленного кислорода. Отношение P:O = 3 (рис. 13.6). В то же время при окислении субстрата через флавопротеиновую дегидрогеназу образуется только 2 моля ATP, т. е. P:O = 2. Эти реакции называют реакциями **окислительного фосфорилирования на уровне дыхательной цепи**. В результате процессов дегидрогенирования при катаболизме глюкозы на путях гликолиза и цикла лимонной кислоты, завершающихся окислительным фосфорилированием, вместе с фосфорилированием на субстратном уровне улавливается в виде высокоэнергетических фосфатов примерно 42% свободной энергии сгорания глюкозы. Очевидно, **что образование ATP в основном происходит за счет функционирования дыхательной цепи.**

ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Скорость дыхания митохондрий может контролироваться концентрацией ADP. Это обусловлено тем, **что окисление и фосфорилирование жестко сопряжены**, т. е. функционирование дыхательной цепи не может осуществляться, если оно не сопровождается фосфорилированием ADP. Чанс и Уильямс предложили рассматривать 5 состояний, при которых скорость дыхания митохондрий лимитируется определенными факторами (табл. 13.1).

Обычно бóльшая часть клеток, находящихся в покоящемся состоянии, пребывает в состоянии 4, при котором скорость дыхания определяется доступностью ADP. Энергия, необходимая для совершения работы, поставляется за счет превращения ATP в ADP; в результате создаются условия для увеличения скорости дыхания, что в свою очередь приводит к восполнению запасов ATP (рис. 13.7). Очевидно, что при определенных условиях на скорость работы дыхательной цепи может влиять и концентрация неорганического фосфата. При повышении скорости дыхания (вызванном, например, физической работой) клетка приближается к состоянию 3 или состоянию 5: либо исчерпываются возможности дыхательной цепи, либо величина P_O опускается ниже значения K_M для цитохрома a_3. Скоростьлимитирующим фактором может оказаться ATP/ADP-транслокатор (см. 138), обеспечивающий поступление ADP из цитозоля в митохондрии.

Таким образом, механизм, с помощью которого улавливается свободная энергия окисления пищевых продуктов, является ступенчатым, эффективным (40—45%) и регулируемым, а не взрывоподобным, неэффективным и неконтролируемым. Часть свободной энергии, которая не улавливается в форме высокоэнергетических фосфатов, освобождается в форме **теплоты**. Это совсем не означает, что она пропадает напрасно — у теплокровных животных она используется для поддержания температуры тела.

Таблица 13.1. Состояния дыхательного контроля

Состояния	Факторы, лимитирующие скорость дыхания
1	Доступность ADP и субстратов
2	Доступность субстратов
3	Возможности самой дыхательной цепи при насыщающих количествах всех субстратов и компонентов
4	Доступность ADP
5	Доступность кислорода

ИНГИБИТОРЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Значительная информация о дыхательной цепи была получена при использовании различных ингибиторов; предполагаемые места их действия показаны на рис. 13.6. Ингибиторы можно разделить на 3 группы: ингибиторы собственно дыхательной цепи, ингибиторы окислительного фосфорилирования и разобщители окислительного фосфорилирования.

Ингибиторы, блокирующие дыхательную цепь, по-видимому, действуют в трех местах. Одно из них ингибируется **барбитуратами** (например, **амобарбиталом**), а также антибиотиком **пиерицидином А** и **ротеноном**[1]. Эти ингибиторы препятствуют окислению субстратов, которые поставляют восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь при участии NAD-

[1] Высокотоксичное вещество, добываемое из растений, которое использовалось американскими индейцами в качестве яда для рыб.— *Прим. перев.*

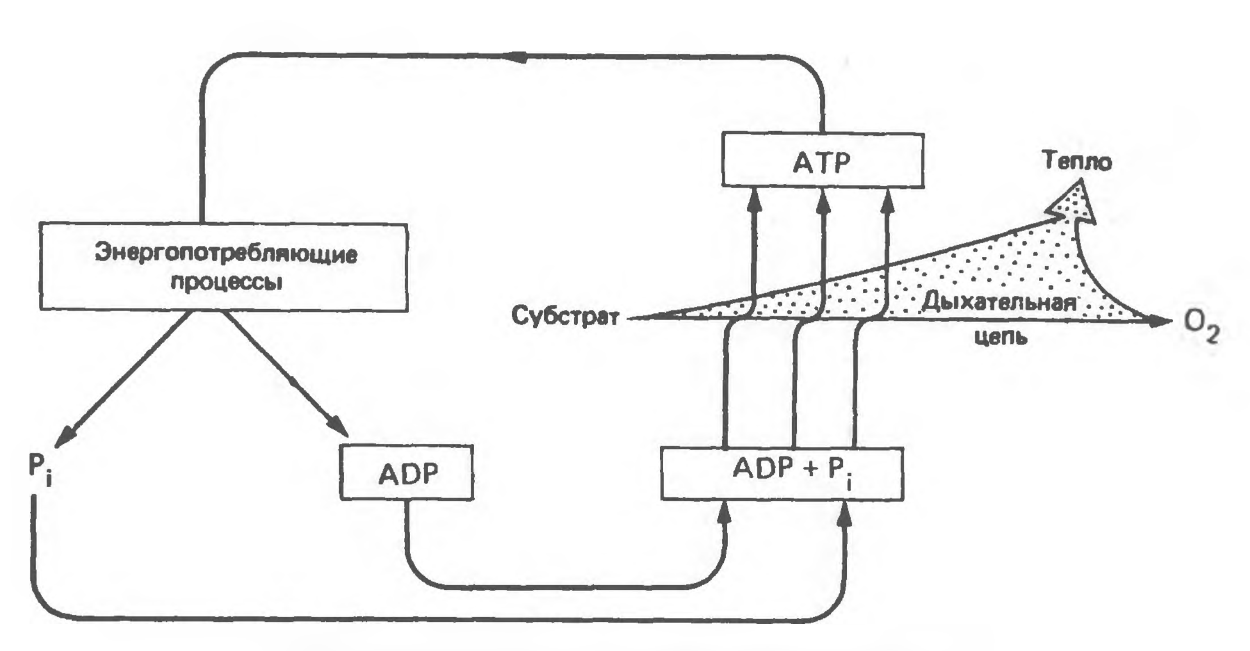


Рис. 13.7. Роль ADP в дыхательном контроле.

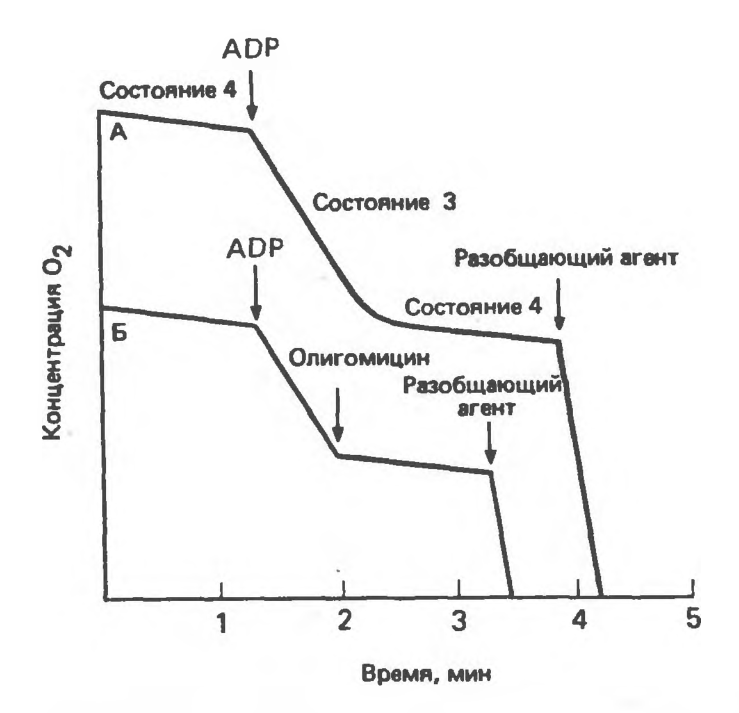


Рис. 13.8. Дыхательный контроль в митохондриях. Эксперимент А: исходный уровень дыхания в состоянии 4, добавление ADP приводит к ускорению дыхания. После фосфорилирования экзогенного ADP с образованием ATP дыхание возвращается к уровню состояния 4. Добавление разобщителя, например динитрофенола, вызывает дыхание, не сопряженное с фосфорилированием. В эксперименте Б добавление олигомицина блокирует фосфорилирование экзогенного ADP, а также дыхание. Последующее добавление разобщителя вызывает дыхание, не сопряженное с фосфорилированием.

зависимых дегидрогеназ,— примером таких субстратов является гидроксибутират.

Димеркапрол и **антимицин А** ингибируют дыхательную цепь на участке между цитохромом *b* и цитохромом *c*. Классические яды — **H_2S, окись углерода** и **цианид** — ингибируют цитохромоксидазу. **Карбоксин** и **TTFA** (теноилтрифторацетон) специфически ингибируют переход восстановительных эквивалентов от сукцинатдегидрогеназы на кофермент Q, а **малонат** является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы.

Антибиотик **олигомицин** полностью блокирует окисление и фосфорилирование в интактных митохондриях. Однако если вместе с олигомицином добавить к системе разобщитель **динитрофенол**, то окисление протекает, но без фосфорилирования. Это означает, что олигомицин не действует непосредственно на дыхательную цепь, а подавляет стадию фосфорилирования (рис. 13.8).

Атрактилозид ингибирует окислительное фосфорилирование, блокируя транспорт адениновых нуклеотидов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Он ингибирует транспорт ADP в митохондрии и выход ATP из митохондрий (рис. 13.16).

Разобщители нарушают систему сопряжения процессов окисления в дыхательной цепи и фосфорилирования. В этих условиях процесс дыхания происходит неконтролируемым образом, поскольку концентрации ADP или P_i не являются лимитирующими. Чаще всего в качестве разобщителя используют 2,4-динитрофенол; аналогичное действие оказывает ряд других соединений: динитрокрезол, пентахлорфенол, CCCP (карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон). Последний по эффективности в 100 раз превосходит динитрофенол.

Энергонезависимая трансгидрогеназа

Имеются данные о функционировании энергозависимой трансгидрогеназы, катализирующей перенос водородов с NADH на NADP. При этом необходимая для реакции энергия поставляется либо непосредственно дыхательной цепью (процесс не блокируется олигомицином), либо в виде ATP (процесс блокируется олигомицином).

МЕХАНИЗМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Для объяснения механизма сопряжения окисления и фосфорилирования были выдвинуты две принципиальные гипотезы. **Химическая гипотеза** постулирует прямое химическое сопряжение на всех стадиях процесса, как при образовании ATP в процессе гликолиза. Предполагается, что существует интермедиат, богатый энергией (I ~ X), связывающий процессы окисления и фосфорилирования. Поскольку такое соединение до сих пор не было обнаружено, эта гипотеза в известной мере дискредитирована и в дальнейшем не будет рассматриваться (подробно об этом вопросе можно прочесть в обзоре: Harper, Rodwell and Mayes, 1979). **Хемиосмотическая теория** постулирует, что при окислении компонентов дыхательной цепи генерируются ионы водорода, которые выходят на наружную сторону сопрягающей митохондриальной мембраны. Возникающая в результате асимметричного распределения ионов водорода (протонов, H^+) разность электрохимических потенциалов используется для приведения в действие механизма образования ATP.

Были выдвинуты и другие гипотезы; согласно одной из них, энергия окисления запасается в форме изменения конформации молекул, а затем используется для генерирования богатых энергией фосфатных связей.

Хемиосмотическая теория

Согласно Митчеллу, первичным событием в окислительном фосфорилировании является транслокация протонов (H^+) на наружную сторону сопрягающей мембраны (внутренней митохондриальной мембраны), осуществляемая за счет процесса окисления в дыхательной цепи. При этом предполагается, что мембрана непроницаема для ионов вообще, особен-

но для протонов, которые накапливаются на наружной стороне мембраны, создавая **по обе стороны мембраны разность электрохимических потенциалов** ($\Delta \mu_{H^+}$). Она складывается из химического потенциала (разность pH) и электрического потенциала. Разность электрохимических потенциалов обеспечивает действие **локализованной в мембране АТР-синтазы** (или обращение процесса, катализируемого локализованной в мембране АТР-гидролазой), которая в присутствии P_i + ADP синтезирует АТР (рис. 13.9). Таким образом, нет необходимости в высокоэнергетическом промежуточном соединении, общем для процессов окисления и фосфорилирования, как это постулирует химическая гипотеза.

Предполагается, что дыхательная цепь в мембране уложена в виде трех окислительно-восстановительных **(о/в)** петель, которые образованы комплексами I, III и IV соответственно. Идеализированная петля, состоящая из переносчиков водорода и переносчика электронов, показана на рис. 13.10. Возможная конфигурация дыхательной цепи, уложенной в три функциональные о/в петли, показана на рис. 13.11.

Согласно этой схеме, перенос каждой пары электронов от NADH на кислород сопровождается транслокацией 6 протонов с внутренней на наружную сторону митохондриальной мембраны. Сначала NADH отдает один протон и два электрона, которые вместе с еще одним протоном из матрикса митохондрии восстанавливают FMN в $FMNH_2$. FMN является частью большого белкового комплекса, пронизывающего всю толщу мембраны, что позволяет ему высвободить два протона на наружной стороне мембраны, а затем возвратить два электрона на внутреннюю сторону при участии FeS-белков, которые при этом восстанавливаются. Каждый восстановленный FeS-комплекс отдает один электрон молекуле убихинона (Q), которая, принимая протоны с внутренней стороны мембраны, превращается в QH_2. QH_2, будучи липидрастворимой небольшой молекулой, легко перемещается к наружной стороне мембраны, где освобождает пару протонов, а два электрона передает следующему переносчику дыхательной цепи — цитохрому *b*. Этот переносчик (в виде комплекса цитохромов b_{566} и b_{562}) также, как полагают, пронизывает митохондриальную мембрану; это позволяет ему передавать электроны другой молекуле убихинона, которая одновременно присоеди-

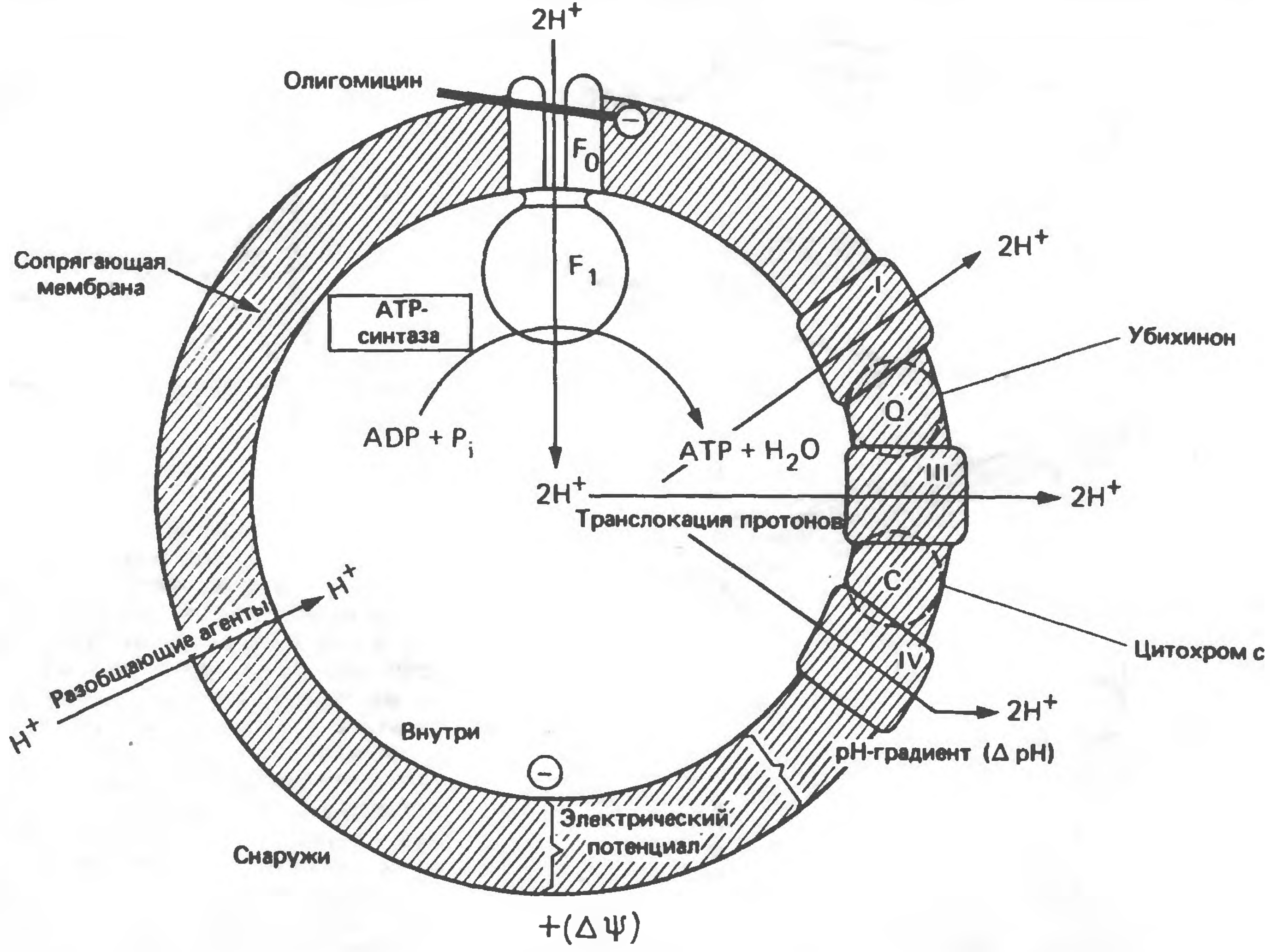


Рис. 13.9. Принципы, лежащие в основе хемиосмотической теории окислительного фосфорилирования, F_1 и F_0 — белковые субъединицы, ответственные за фосфорилирование. Основной поток протонов создается сопряжением окисления с транслокацией протонов, переносимых с внутренней на наружную сторону мембраны; эта транслокация осуществляется комплексами дыхательной цепи I, III и IV, каждый из которых действует как протонная помпа. Разобщители, например динитрофенол, вызывают утечку H^+ через мембрану, сильно снижая электрохимический протонный градиент. Олигомицин специфически блокирует поток протонов через F_0.

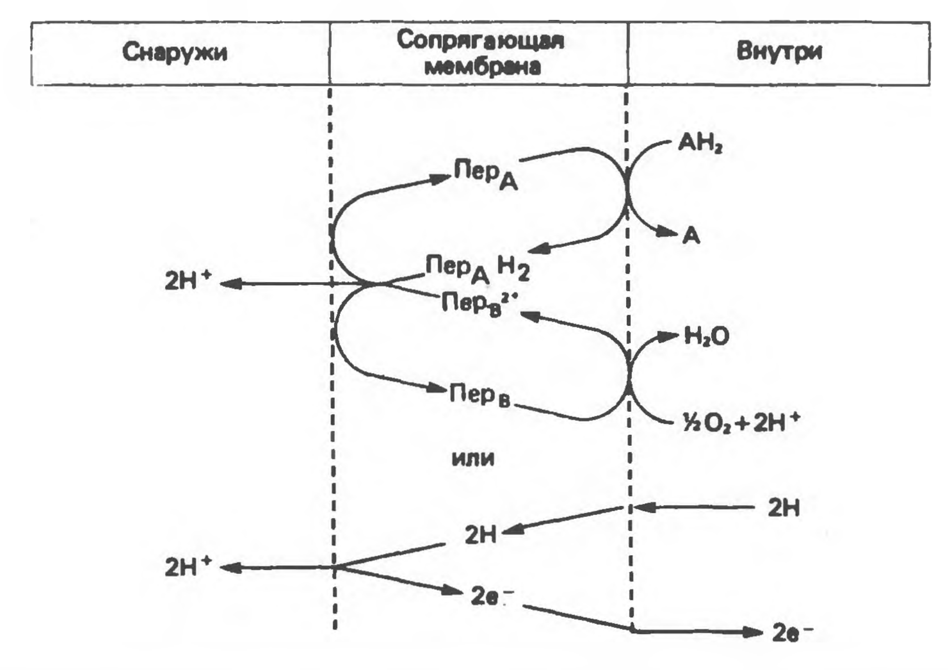


Рис.13.10. Окислительно-восстановительная (о/в) петля переноса протонов (хемиосмотическая теория); Пер — переносчик.

Цитозоль (снаружи, с-сторона)
Внутренняя митохондриальная мембрана
Матрикс (внутри, м-сторона)
$NADH + H^+$
$FMNH_2$
NAD^+
$2H^+$
$2e^-$
FeS
FeS
$2H^+$
QH_2
$2H^+$
$2e^-$
b_{566}
b_{562}
$2H^+$
QH_2
?
$2H^+$
FeS
$2e^-$
c_1
c
a
Cu
a_3
Cu
$½O_2 + 2H^+$
H_2O

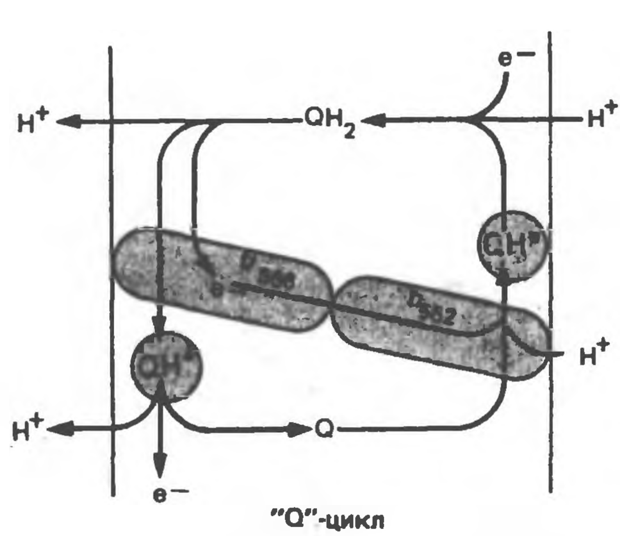


Рис. 13.11. Возможная конфигурация о/в петель в дыхательной цепи (хемиосмотическая теория). Схема в значительной мере имеет предположительный характер; это особенно относится к области, где происходит взаимодействие Q с цитохромом *b*, поскольку природа интермедиатов и их относительное расположение точно не известны. Возможно. что в данном случае функционирует «Q-цикл», обеспечивающий транслокацию протонов, с участием семихинона (отмечен звездочкой), как указано на рисунке справа. На обеих сторонах мембраны семихинон фиксируется Q-связывающими белками, тогда как QH_2 и Q являются мобильными. Цитохромы расположены в последовательности *b*, c_1, *c*, *a*, a_3 (последний является частью цитохрома aa_3, пронизывающего мембрану). FeS — железо-серный белок. Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что цитохром *c*-оксидоредуктаза работает как протонная помпа (см. рис. 13.9).

няет еще два протона из матрикса. QH_2 совершает еще один челночный рейс на наружную поверхность, где освобождаются два протона, а два электрона передаются двум молекулам цитохрома *c*. Недавно постулированный Q-цикл, в пользу которого получены убедительные данные (рис. 13.11), предполагает, что семихинон QH_2 является Н-переносящим компонентом двух о/в петель. Далее электроны проходят оставшуюся часть цитохромной цепи по мембране до цитохрома a_3, находящегося на внутренней стороне мембраны. Здесь два электрона соединяются с двумя протонами (H^+) из матрикса и атомом кислорода, образуя воду.

Внутренняя мембрана содержит ряд белков — ферментов дыхательной цепи, уложенных в мембране по соседству друг с другом, как показано на рис. 13.11. При этом на поверхности внутренней мембраны находятся фосфорилирующие субъединицы, ответственные за образование АТР (рис. 13.12). Они состоят из нескольких белков, в совокупности образующих F_1-субъединицу; последняя выступает в матрикс и представляет собой АТР-синтазу (рис. 13.9). F_1-субъединицы с помощью «стебелька» связаны с мембранной белковой субъединицей F_0, пронизывающей, вероятно, всю мембрану (рис. 13.9). При прохождении через (F_0—F_1)-комплекс пары протонов из ADP и P_i образуется одна молекула АТР. Интересно, что сходные фосфорилирующие субъединицы находятся на внутренней стороне плазматической мембраны бактерий и на наружной стороне тилакоидной мембраны хлоропластов. Важно отметить, что в митохондриях и бактериях градиент протонов направлен снаружи внутрь, тогда как в хлоропластах он имеет противоположное направление.

Представления о механизме сопряжения транслокации протонов с синтезом АТР анизотропной (векторной) АТР-синтазной системой имеют в значительной мере предположительный характер. Модель, предложенная Митчеллом, показана на рис. 13.13. Пара протонов атакует один из атомов кислорода молекулы P_i, при этом образуются H_2O и активная форма P_i, которая сразу же соединяется с ADP, образуя АТР. Согласно данным представлениям, синтез АТР не является главной энергопотребляющей стадией; скорее такой стадией является освобождение АТР из активного центра, которое, вероятно, связано с конформационными изменениями субъединицы F_1.

В пользу хемиосмотической теории говорят следующие экспериментальные данные:

1. Добавление протонов в среду, в которой находятся митохондрии, приводит к образованию АТР.

2. Окислительное фосфорилирование не происходит в растворимых системах, в которых не может функционировать векторная АТР-синтаза. Для протекания окислительного фосфорилирования необходима замкнутая мембранная система (рис. 13.9).

3. Компоненты дыхательной цепи уложены в мембране упорядоченно, «бок о бок», поперек мембраны, как предусматривается хемиосмотической теорией (рис. 13.11).

4. Коэффициент $P:H^+$ для АТР-синтазы равен

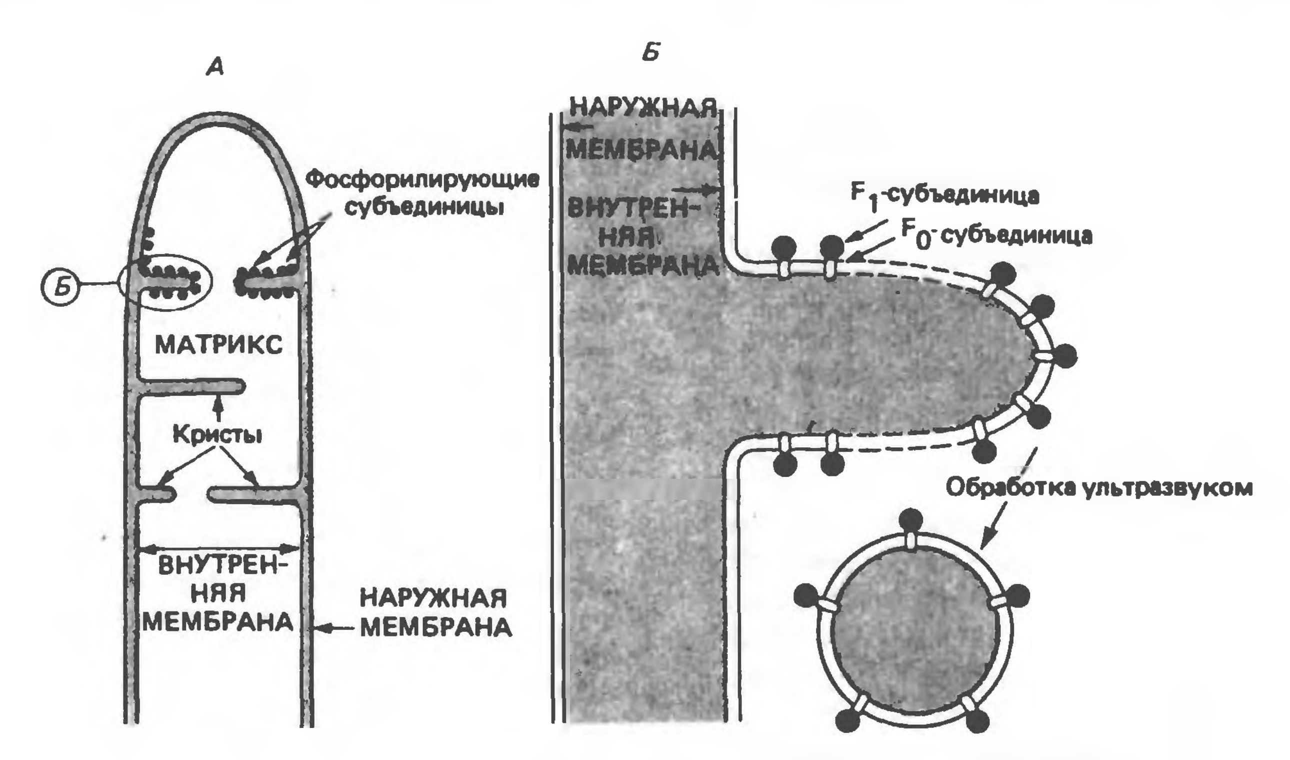


Рис. 13.12. Структура митохондриальных мембран. Субмитохондриальные частицы «вывернуты наружу» и позволяют изучать замкнутые мембранные системы, у которых фосфорилирующие субъединицы оказываются снаружи, а градиент протонов имеет «обратное» направление.

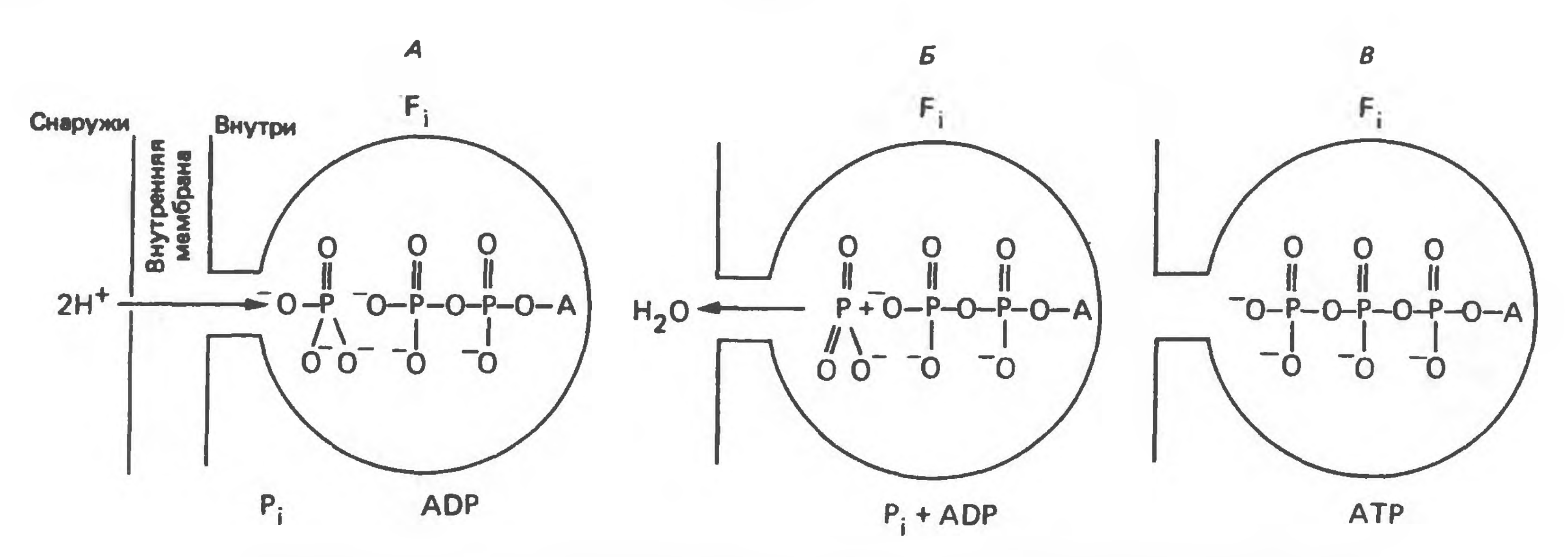


Рис. 13.13. Перенос протонов при участии АТР-синтазной системы (по Митчеллу).

1 : 2, а коэффициент $H^+ : O$ для окисления сукцината и 3-гидроксибутирата 4 и 6 соответственно; это примерно согласуется с ожидаемыми соотношениями. Эти данные коррелируют с наличием трех о/в петель дыхательной цепи.

Хемиосмотическая теория позволяет объяснить следующие феномены:

1. Феномен дыхательного контроля. Разность электрохимических потенциалов по обе стороны мембраны, возникающая вследствие транслокации протонов, ингибирует дальнейший транспорт восстановительных эквивалентов по дыхательной цепи до тех пор, пока не произойдет обратная транслокация протонов через мембранную векторную АТР-синтазу. Этот процесс в свою очередь зависит от наличия ADP и P_i.

2. Действие разобщителей. Эти соединения (например, динитрофенол) являются амфипатическими (см. с. 164) и повышают проницаемость мембраны для протонов (рис. 13.9), тем самым понижая электрохимический потенциал и выключая АТР-синтазу по типу короткого замыкания. В этом случае окисление может происходить без фосфорилирования.

3. Функционирование митохондриальных систем обменного транспорта (см. ниже). Этот феномен можно рассматривать как условие функционирования сопрягающей мембраны, которая должна быть непроницаема для протонов и других ионов для того, чтобы поддерживать электрохимический градиент. В мембране работают также системы диффузионного обмена анионов на ионы OH^- и катионов на ионы H^+. Такие системы необходимы для ввода и вывода ионизированных метаболитов при сохранении электрической и осмотической нейтральности.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ

Митохондриальные мембраны и локализация важных ферментов в митохондриях

Митохондрии имеют наружную мембрану, проницаемую для большинства метаболитов, и избирательно проницаемую внутреннюю мембрану со множеством складок (крист), выступающих в сторону матрикса (внутреннего пространства митохондрии) (рис. 13.12). Наружная мембрана может быть удалена путем обработки дигитонином; она характеризуется наличием моноаминоксидазы и некоторых других ферментов (например, ацил-СоА-синтетазы, глицерофосфат-ацилтрансферазы, моноацилглицерофосфат-ацилтрансферазы, фосфолипазы A_2). В межмембранном пространстве находятся аденилаткиназа и креатинкиназа. Во внутренней мембране локализован фосфолипид кардиолипин.

В матриксе находятся растворимые ферменты цикла лимонной кислоты и ферменты β-окисления жирных кислот; в связи с этим возникает необходимость в механизмах транспорта метаболитов и нуклеотидов через внутреннюю мембрану. Сукцинатдегидрогеназа локализована на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, где она передает восстановительные эквиваленты дыхательной цепи на уровне убихинона (минуя первую о/в петлю). 3-Гидроксибутиратдегидрогеназа также локализована на матриксной стороне внутренней митохондриальной мембраны. Глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа находится на наружной поверхности внутренней мембраны, где она участвует в функционировании глицерофосфатного челночного механизма.

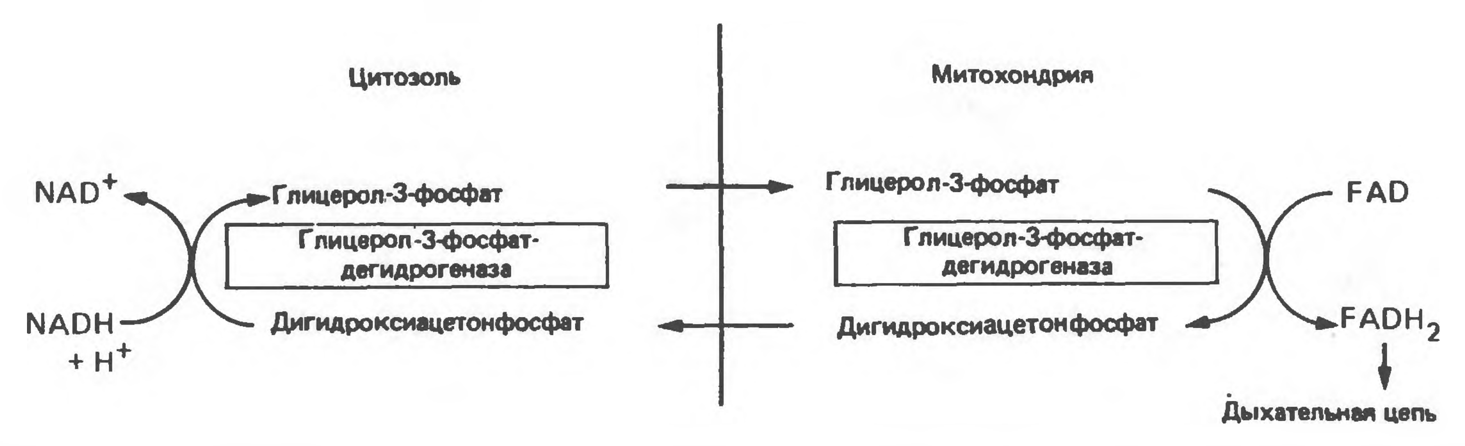


Рис. 13.14. Глицерофосфатный челночный механизм переноса восстановительных эквивалентов из цитозоля в митохондрию.

Окисление внемитохондриального NADH при участии субстратных челночных механизмов

NADH не может проникать через митохондриальную мембрану; он непрерывно образуется в цитозоле глицеральдегидфосфатдегидрогеназой, одним из ферментов гликолиза (см. рис. 18.2). Вместе с тем при аэробных условиях внемитохондриальный NADH не накапливается; он окисляется в дыхательной цепи митохондрий. Для объяснения этой ситуации предложено несколько механизмов. Они предполагают перенос восстановительных эквивалентов через митохондриальную мембрану при участии пар субстратов, связанных соответствующими дегидрогеназами. Необходимо, чтобы с обеих сторон митохондриальной мембраны находилась специфическая дегидрогеназа. Перенос восстановительных эквивалентов при участии **глицерофосфатного челночного** механизма показан на рис. 13.14. Следует отметить, однако, что, поскольку митохондриальный фермент связан с дыхательной цепью через флавопротеин, а не через NAD, на каждый потребленный атом кислорода образуется только две, а не три молекулы ATP. У некоторых видов животных активность FAD-зависимых ферментов понижается после тиреоидэктомии и повышается после введения тироксина. Такой челночный механизм работает в летательной мышце насекомых, в белых мышцах и играет важную роль в печени, однако в других тканях (например, в сердечной мышце) митохондриальная глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа отсутствует. Полагают, что более универсальной является транспортная система, использующая малат и цитозольную и митохондриальную малатдегидрогеназы. Система **«малатного челночного механизма»** показана на рис. 13.15. Сложность этой системы обусловлена тем, что митохондриальная мембрана непроницаема для оксалоацетата, поэтому через митохондриальную систему в цитозоль транспортируются α-кетоглутарат

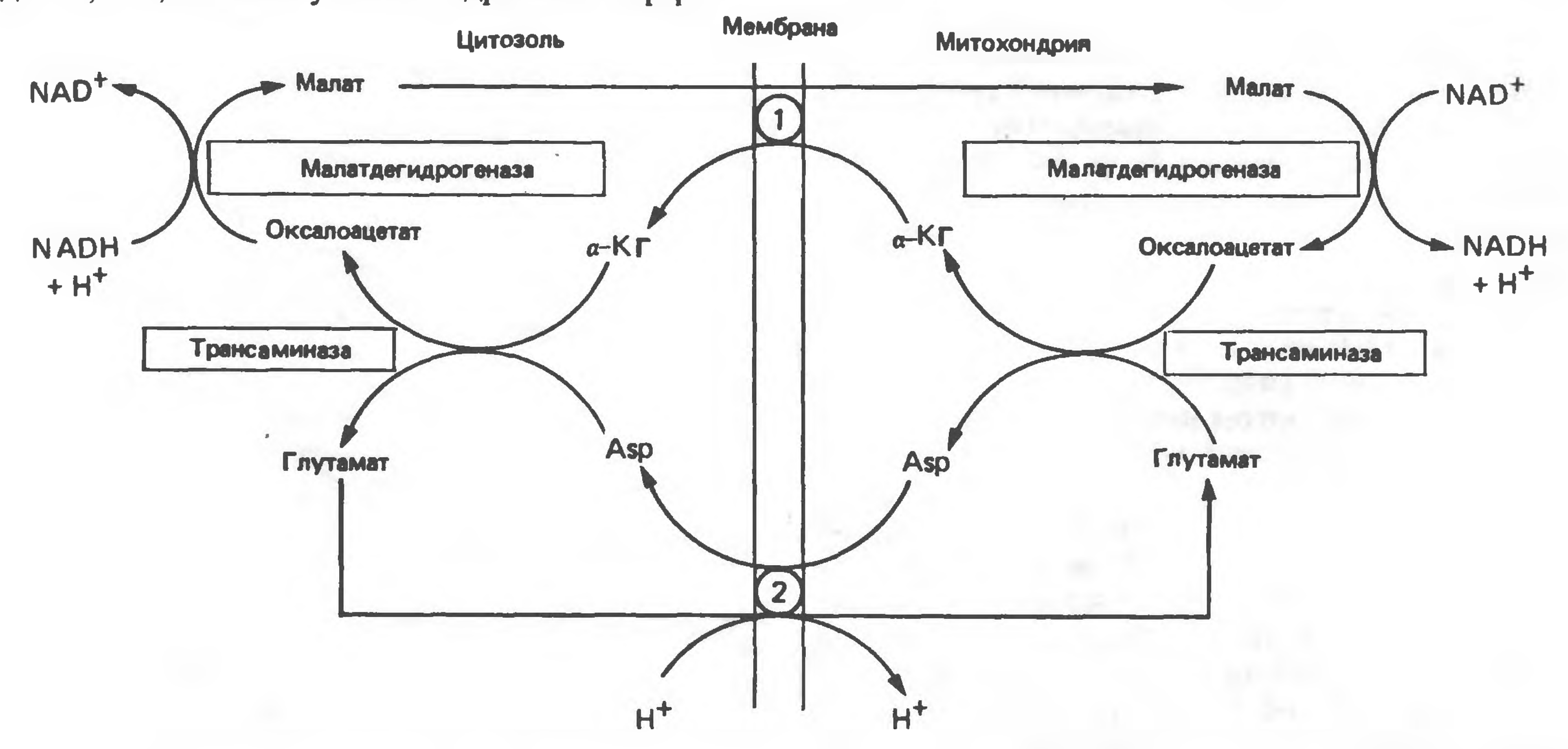


Рис. 13.15. Малатный челночный механизм переноса восстановительных эквивалентов из цитозоля внутрь митохондрии. 1 — переносчик кетоглутарата, 2 — переносчик аспартата и глутамата (обратите внимание на сопряженный перенос протонов).

и аспартат, которые образуются в результате реакции переаминирования оксалоацетата с глутаматом; в цитозоле из α-кетоглутарата вновь образуется оксалоацетат.

Энергозависимый ионный транспорт в митохондриях

В активно дышащих митохондриях, в которых идет окислительное фосфорилирование, накапливаются и поддерживаются на определенном уровне катионы K^+, Na^+, Ca^{2+} и Mg^{2+}, а также P_i. Разобщение дыхания и фосфорилирования динитрофенолом приводит к потере ионов митохондриями; в то же время олигомицин не ингибирует накопление ионов — следовательно, этот процесс идет не за счет энергии, которая запасается путем фосфорилирования ADP. Можно полагать, что транспорт катионов осуществляется за счет работы протонной помпы.

Системы транспорта (рис. 13.16)

Внутренняя бислойная митохондриальная мембрана свободно проницаема для незаряженных небольших молекул, таких, как кислород, вода, CO_2 и NH_3, а также для монокарбоновых кислот, таких, как 3-гидроксимасляная, ацетоуксусная и уксусная. Длинноцепочечные жирные кислоты транспортируются в митохондрии с помощью карнитиновой системы (см. рис. 23.1); имеется также специальный переносчик пирувата, функционирующий по принципу симпорта, использующего градиент протонов с наружной на внутреннюю поверхность митохондриальной мембраны. Транспорт дикарбоксилатных и трикарбоксилатных анионов, а также аминокислот осуществляется с помощью специальных систем переноса, облегчающих их прохождение через мембрану. Монокарбоновые кислоты легче проникают через мембрану вследствие меньшей степени их диссоциации; недиссоциированная форма кислоты имеет бóльшую растворимость в липидах, и, как полагают, именно в этой форме монокарбоновые кислоты проходят через липидную мембрану.

Транспорт ди- и трикарбоксилатных анионов тесно связан с транспортом неорганического фосфата, который легко проникает через мембрану в форме ионов $H_2PO_4^-$ в обмен на OH^-. Малат переносится системой транспорта дикарбоксилатов в обмен на перенос неорганического фосфата в обратном направлении. Перенос цитрата, изоцитрата и *цис*-аконитата системой транспорта трикарбоновых кислот происходит в обмен на перенос малата в обратном направлении. α-Кетоглутарат также поступает в обмен на малат. Таким образом, в результате работы обменных механизмов поддерживается осмотическое равновесие. Следует отметить, что перенос цитрата через митохондриальную мембрану зависит не только от транспорта малата, но также и от транспорта неорганического фосфата. Переносчик адениновых нуклеотидов обменивает ATP на ADP, но не на AMP. Жизненно важной задачей является обеспечение выхода ATP из митохондрий для последующего использования вне митохондрий и одновременного притока ADP для образования ATP внутри митохондрий (рис. 13.17). Ионы Na^+ могут обмениваться на ионы H^+ за счет градиента протонов. Полагают, что при активном транспорте ионов Ca^{2+} внутрь митохондрий происходит перенос единичного положительного заряда на каждый ион, что, возможно, связано с обменом Ca^{2+}/H^+. Выход кальция из митохондрии облегчается при обмене его на Na^+.

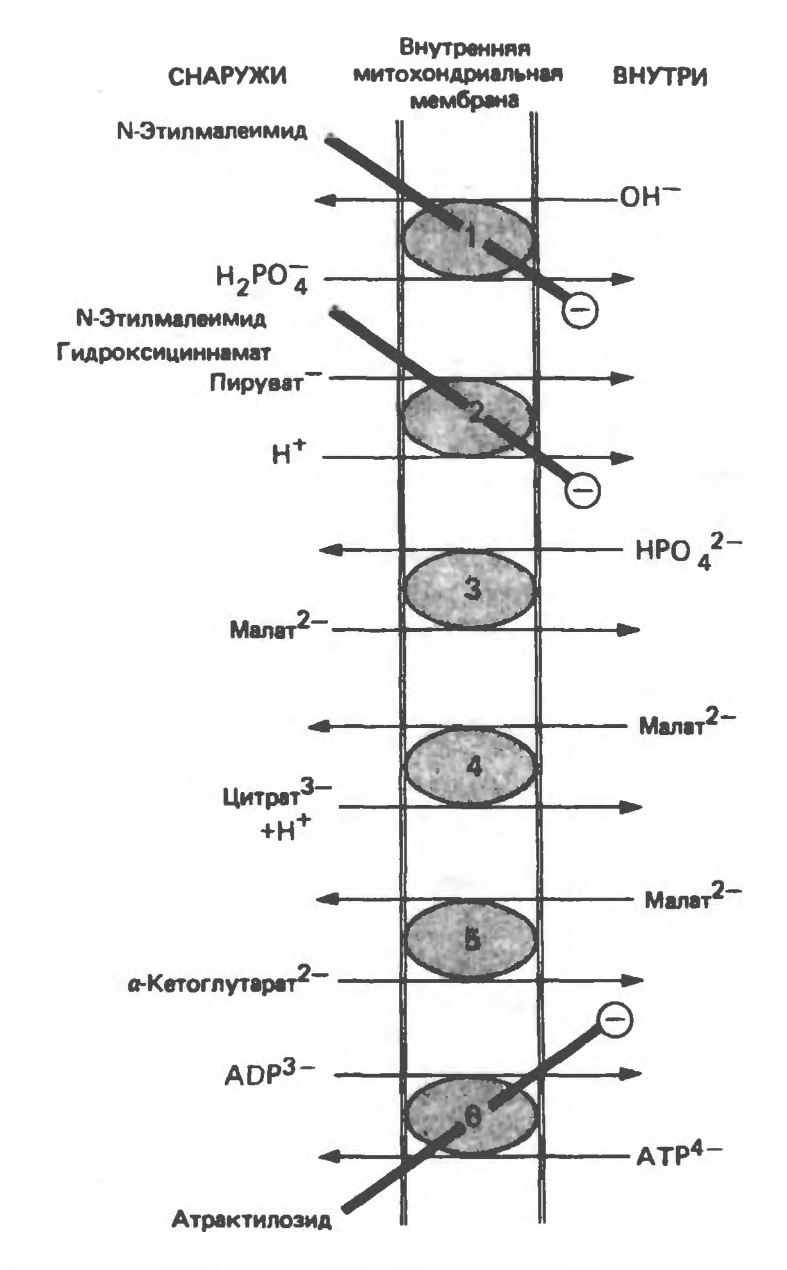


Рис. 13.16. Транспортные системы митохондриальной мембраны. 1 — переносчик фосфата, 2 — симпорт пирувата, 3 — переносчик дикарбоксилатов, 4 — переносчик трикарбоксилатов, 5 — переносчик α-кетоглутарата, 6 — переносчик адениновых нуклеотидов. N-Этилмалеимид, гидроксициннамат и атрактилозид ингибируют (⊖) указанные системы. Имеются также (на рисунке не показаны) системы переноса аспартата и глутамата (см. рис. 13.15), глутамина, орнитина, карнитина (см. рис. 23.1)

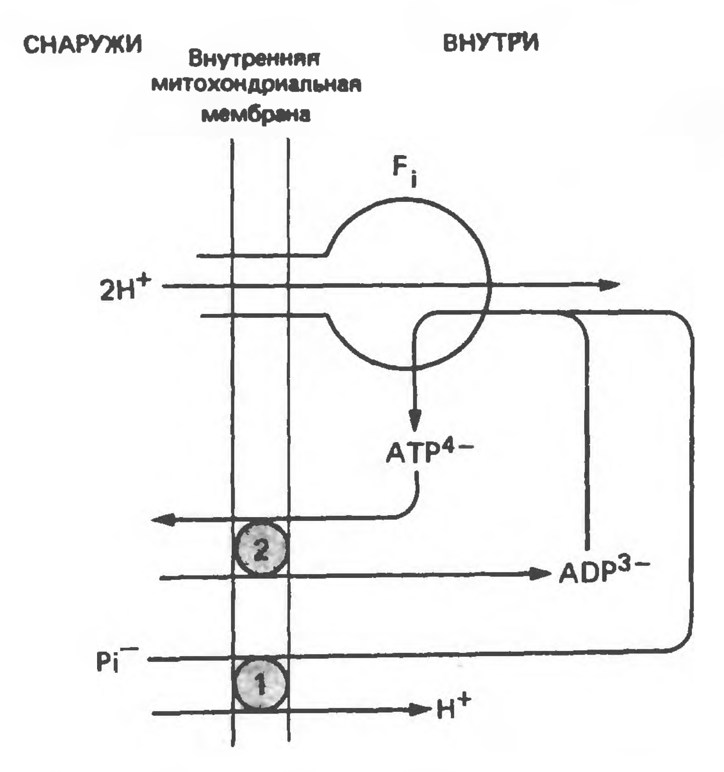


Рис. 13.17. Совместное действие переносчика фосфата (1) и переносчика адениновых нуклеотидов (2) в системе синтеза ATP. Симпорт H^+/P_i эквивалентен антипорту P_i/OH^-, показанному на рис. 13.16. На каждую экспортированную из митохондрии молекулу ATP в митохондрию поступают три протона. Если же ATP используется внутри митохондрии, то поступают только два протона. Эта модель предусматривает стехиометрическое соотношение: 3 перенесенных протона на электронную пару на каждом участке сопряжения (в отличие от гипотезы Кросса, предполагающей перенос только двух протонов); она не противоречит первоначальной гипотезе Митчелла (рис. 13.11) (2 протона на каждую электронную пару на каждом участке сопряжения) при значении отношения P/O, равном 2 для NADH-зависимого окисления и 1,3 для окисления сукцината (по Хинклю).

Действие ионофоров

Соединения, о которых идет речь, получили свое название вследствие их способности специфически связывать определенные катионы и облегчать их транспорт через биологические мембраны. Эти свойства ионофоров обусловлены их липофильным характером, благодаря чему они проникают через липидные мембраны, в частности через митохондриальную мембрану. Примером служит антибиотик **валиномицин**, который переносит K^+ через митохондриальную мембрану и тем самым снижает мембранный потенциал между внутренней и наружной сторонами. **Нигерицин** также действует как ионофор для ионов K^+, но в обмен на H^+; в этом случае снижается градиент pH между сторонами мембраны. При одновременном присутствии валиномицина и нигерицина утрачиваются и мембранный потенциал, и градиент pH, что приводит к полному ингибированию фосфорилирования. Классические разобщители, такие, как динитрофенол, по сути дела являются протонными ионофорами.

Нарушения в работе дыхательной цепи

Состояние **фатальной детской митохондриальной миопатии и дисфункции почек** связано со снижением содержания или полным отсутствием большинства оксидоредуктаз дыхательной цепи.

ЛИТЕРАТУРА

Cross R. L. The mechanism and regulation of ATP synthesis by F_1-ATPases, Annu. Rev. Biochem., 1981, **50**, 681.

Harper H. A., Rodwell V. W., Mayes P. A. Page 276. In: Review of Physiological Chemistry, 17th ed., Lange, 1979.

Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system, Annu. Rev. Biochem., 1985, **54**, 1015.

Hinkle P. C., McCarty R. E. How cells make ATP, Sci. Am. (March), 1978, **238**, 104.

Hinkle P. C., Yu M. L. The phosphorus/oxigen radio of mitochondrial oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem., 1979, **254**, 2450.

Mitchell P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, Science, 1979, **206**, 1148.

Nicholls D. G. Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory, Academic Press, 1982.

Tyler D. D. The mitochondrial ATP synthase, Page 117. In: Membrane Structure and Function, Vol. 5, Bittar E. E. (ed.), Wiley, 1984.

Tyler D. D., Sutton C. M. Mitochondrial transporting systems, Page 181. In: Membrane Structure and Function, Vol. 5, Bittar E. E. (ed.), Wiley, 1984.

Глава 14

Физиологически важные углеводы

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Углеводы широко представлены в растениях и животных, где они выполняют как структурные, так и метаболические функции. В растениях в процессе фотосинтеза из углекислого газа и воды синтезируется глюкоза, которая далее запасается в виде крахмала или превращается в целлюлозу — структурную основу растений. Животные способны синтезировать ряд углеводов из жиров и белков, но бо́льшая часть углеводов поступает с пищей растительного происхождения.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Знания о структуре и свойствах физиологически важных углеводов необходимы для понимания их фундаментальной роли в материальном и энергетическом обеспечении жизни млекопитающих. Наиболее важным углеводом является шестиуглеродный сахар глюкоза. Именно в форме глюкозы поступает в кровь основная масса углеводов из пищи; в глюкозу же превращаются углеводы в печени и из клюкозы могут образовываться все остальные углеводы в организме. Глюкоза используется как основной вид топлива в тканях млекопитающих (исключение составляют жвачные животные) и служит универсальным топливом в период эмбрионального развития. Она превращается в другие углеводы, выполняющие высокоспецифичные функции — в гликоген, являющийся формой хранения энергии, в рибозу, содержащуюся в нуклеиновых кислотах, в галактозу, которая входит в состав лактозы молока. Некоторые углеводы входят в состав сложных липидов и образуют вместе с белками гликопротеины и протеогликаны. С нарушением обмена углеводов тесно связан ряд заболеваний — сахарный диабет, галактоземия, нарушения в системе запасания гликогена, нетолерантность к молоку.

КЛАССИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДОВ

В химическом плане углеводы можно определить как альдегидные или кетонные производные полиатомных (содержащих более одной ОН-группы) спиртов или как соединения, при гидролизе которых образуются эти производные.

1) **Моносахариды** — углеводы, которые не могут быть гидролизованы до более простых форм. Их можно подразделить на **триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы** и **октозы** в зависимости от числа содержащихся в их молекуле атомов углерода; их можно разделить также на **альдозы** и **кетозы** в зависимости от присутствия альдегидной или кетонной группы. Примерами могут служить

	Альдозы	**Кетозы**
Триозы ($C_3H_6O_3$)	Глицероза	Дигидроксиацетон
Тетрозы ($C_4H_8O_4$)	Эритроза	Эритрулоза
Пентозы ($C_5H_{10}O_5$)	Рибоза	Рибулоза
Гексозы ($C_6H_{12}O_6$)	Глюкоза	Фруктоза

2) **Дисахариды** при гидролизе дают две молекулы моносахарида (одинаковых или различных). Примерами служат сахароза, лактоза и мальтоза.

3) **Олигосахариды** при гидролизе дают 3—6 моносахаридов. Примером может служить мальтотриоза [1].

4) **Полисахариды** дают при гидролизе более 6 молекул моносахаридов. Они могут быть линейными или разветвленными. Примерами служат крахмал и декстрины. Иногда их называют гексозанами или пентозанами, а также гомополисахаридами или гетерополисахаридами — в зависимости от

---

[1] Это не триоза, а трисахарид, содержащий три остатка α-глюкозы.

того, идентичные или неидентичные моносахариды образуются при их гидролизе.

МОНОСАХАРИДЫ

Структура глюкозы

Линейная формула глюкозы (альдогексоза, рис. 14.1, *А*) может объяснить ряд ее свойств, но в термодинамическом отношении более предпочтительна циклическая формула, которая полностью объясняет химические свойства глюкозы. Для большинства целей структурную формулу глюкозы можно изображать в виде простого кольца с передачей перспективы, как это предложил Хеуорс (рис. 14.1, *Б*). По данным рентгеноструктурного анализа шестичленное кольцо, содержащее один атом кислорода, в действительности имеет конформацию кресла (рис. 14.1, *В*).

Изомерия сахаров

Соединения, имеющие одну и ту же структурную формулу, но различающиеся по пространственной конфигурации, называются **стереоизомерами**. Образование таких изомеров оказывается возможным

А

Б

В

Рис. 14.1. α-D-глюкоза.

L-Глицероза (L-Глицеральдегид)

D-Глицероза (D-Глицеральдегид)

L-Глюкоза

D-Глюкоза

Рис. 14.2. D- и L-изомеры глицерозы и глюкозы.

при вхождении в состав молекулы асимметрических атомов углерода (к которым присоединены четыре различных атома или группы). Число возможных изомеров данного соединения зависит от числа асимметрических атомов углерода (n) и равно 2^n. Глюкоза с четырьмя асимметрическими атомами углерода имеет, следовательно, 16 изомеров. Ниже указаны наиболее важные типы изомеров глюкозы.

1. **D** и **L**: обозначение изомера как D-формы или как L-формы, являющейся ее зеркальным отображением, основано на сравнении пространственной конфигурации изомера с конфигурацией «родительского» соединения углеводного семейства — трехуглеродного сахара глицеральдегида (глицерозы). L- и D-формы этого сахара изображены на рис. 14.2 вместе с соответствующими изомерами глюкозы. Принадлежность к D- или L-ряду определяется ориентацией групп —H и —OH при атоме углерода, **соседнем** с концевым атомом углерода, содержащим первичную спиртовую группу (в молекуле глюкозы — ориентацией групп —H и —OH при атоме углерода 5). Если группа —OH при этом углероде находится справа (как показано на рис. 14.2), сахар принадлежит к D-ряду, если же она стоит слева, сахар относится к L-ряду. Большинство моносахаридов в организме млекопитающих имеют D-конфигурацию — именно к этой конфигурации специфичны ферменты, ответственные за их метаболизм.

Присутствие асимметрических атомов углерода является причиной **оптической активности** соединения. Если пучок плоскополяризованного света проходит через раствор **оптического изомера**, плоскость поляризации света поворачивается либо вправо (правовращающий изомер, +), либо влево (левовращающий изомер, −). Соединение обозначают D(−), D(+), L(−) или L(+); это обозначение показывает наличие структурного родства с D- или L-глицеральдегидом, но не обязательно тот же знак оптического вращения. Например, природной формой фруктозы является D(−)-изомер.

Если D- и L-изомеры присутствуют в равных количествах, их смесь не проявляет оптической активности — активности изомеров компенсируют одна другую. Такие смеси называют **рацемическими** (или DL-смесями). Соединения, получаемые синтетическим путем, оказываются рацемическими, поскольку в этом случае вероятности образования каждого из изомеров одинаковы.

2. **Пиранозные и фуранозные кольцевые структуры.** Эта терминология основана на существовании двух устойчивых кольцевых структур моносахаридов, сходных со структурами пирана или фурана (рис. 14.3). Кольцевую структуру могут принимать и кетозы (например, D-фруктофураноза или D-фруктопираноза; рис. 14.4). В растворе глюкозы более 99% молекул находится в пиранозной форме и менее 1% — в фуранозной форме.

3. **α- и β-аномеры.** Кольцевая структура альдозы — полуацетальная, так как она образуется в результате взаимодействия альдегидной и спиртовой групп (рис. 14.5), кольцевая структура кетозы — полукетальная. Кристаллическая глюкоза является

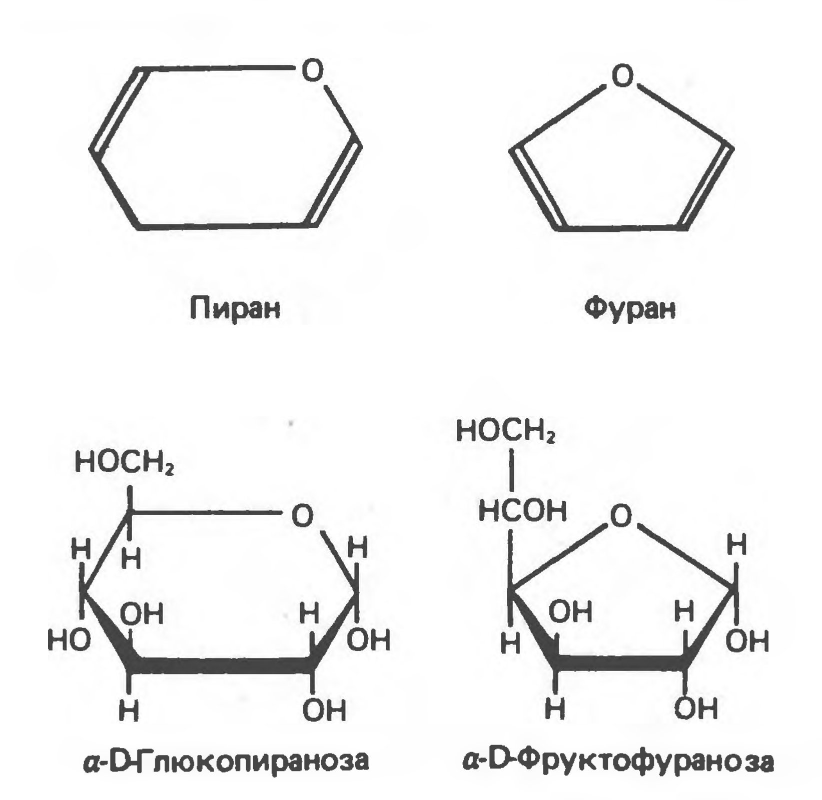
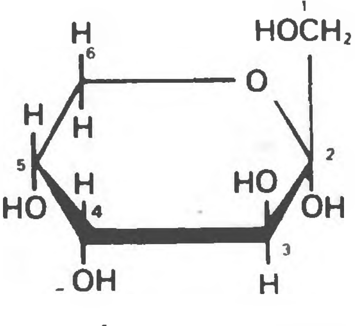


Рис. 14.3. Пиранозная и фуранозная формы глюкозы.



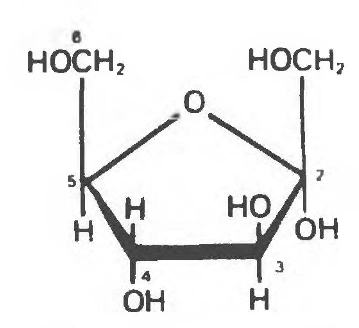


Рис. 14.4. Пиранозная и фуранозная формы фруктозы.

глюкопиранозой. Циклическая структура сохраняется и в растворе, но при этом происходит образование изомеров относительно положения 1, которое занимает карбонильный или **аномерный атом углерода**, что приводит к образованию смеси α-глюкопиранозы (36%) и β-глюкопиранозы (63%); оставшийся 1% представлен в основном α- и β-аномерами глюкофуранозы. Описанное выше установление равновесия сопровождается так называемой **мутаротацией**: полуацетальное кольцо раскрывается и вновь замыкается, при этом может изменяться положение групп —H и —OH при углероде 1. Предполагают, что в ходе этого процесса образуется промежуточная гидратированная линейная (ациклическая) молекула, хотя по данным полярографии на долю ациклической формы глюкозы приходится всего 0,0025%. В растворе глюкоза является правовращающей; этим объясняется еще одно ее название — **декстроза** (декстро — правый), часто употребляемое в клинической практике.

4. **Эпимеры.** Изомеры, различающиеся по конфигурации положением групп —H и —OH при втором, третьем и четвертом атомах углерода, называются эпимерами. Биологически наиболее важными эпимерами глюкозы являются манноза и галактоза, образующиеся путем эпимеризации при атомах углерода 2 и 4 соответственно (рис. 14.6).

5. **Альдо-кето-изомеризация.** Фруктоза имеет ту же химическую формулу, что и глюкоза, но отличается по структурной формуле, поскольку фруктоза содержит потенциальную кетонную группу в положении 2, а глюкоза — потенциальную альдегидную группу в положении 1 (рис. 14.3 и 14.4).

α-D-Глюкопираноза

β-D-Глюкопираноза

Ациклическая альдегидная форма

Рис. 14.5. Мутаротация глюкозы.

Физиологически важные моносахариды

В ходе метаболической деградации глюкозы при гликолизе образуются производные различных триоз. Метаболические превращения глюкозы по пентозофосфатному пути приводят к образованию производных триоз, тетроз и пентоз, а также к образованию семиуглеродного сахара (седогептулозы). Пятиуглеродные моносахариды, пентозы, являются важными компонентами нуклеотидов, нуклеиновых кислот и многих коферментов (табл. 14.1). Из гексоз наиболее важное физиологическое значение имеют глюкоза, галактоза, фруктоза и манноза (табл. 14.2).

Структура биологически важных альдосахаров показана на рис. 14.7. Пять кетосахаров, играющих важную роль в метаболизме, представлены на рис. 14.8.

Самостоятельное значение имеют производные глюкозы, содержащие карбоксильную группу: α-D-глюкуронат (компонент глюкуронидов и гликозаминогликанов) и его метаболические производные β-L-идуронат (компонент гликозаминогликанов, рис. 14.9) и L-гулонат (участвует в метаболизме уроновой кислоты, см. рис. 21.1).

Гликозиды

Гликозиды — это соединения, образующиеся путем конденсации моносахарида (или моносахаридного остатка в составе более сложного сахара) с гидроксильной группой другого соединения, которым может быть другой моносахарид или вещество неуглеводной природы (тогда его называют **агликоном**). Гликозидную связь называют **ацетальной**, так как она образуется в результате реакции между полуацетальной группой (образующейся при взаимодействии альдегида с —OH-группой) и другой —OH-группой. Если полуацетальная группа принадле-

α-D-Галактоза

α-D-Глюкоза

α-D-Манноза

Рис. 14.6. Эпимеризация глюкозы.

Таблица 14.1. Физиологически важные пентозы

Сахар	Местонахождение	Биохимическое значение	Клиническое значение
D-Рибоза	Нуклеиновые кислоты	Структурный элемент нуклеиновых кислот и коферментов (например, ATP, NAD, NADP, флавопротеинов). Является промежуточным соединением пентозофосфатного пути	
D-Рибулоза	Образуется в ходе метаболизма	Промежуточное соединение пентозофосфатного пути	
D-Арабиноза	Гуммиарабик, сливовая и вишневая мякоть	Компонент гликопротеинов	
D-Ксилоза	Древесная смола, протеогликаны, гликозаминогликаны	Компонент гликопротеинов	
D-Ликсоза	Сердечная мышца	Компонент ликсофлавина, выделяемого из сердечной мышцы человека	
L-Ксилулоза	Промежуточное соединение метаболизма уроновой кислоты		Обнаруживается в моче при пентозурии

жит глюкозе, образующееся соединение называют **глюкозидом**, если галактозе — **галактозидом** и т. д.

Гликозиды найдены в составе многих лекарств и пряностей, они являются также компонентами животных тканей. Агликонами могут быть метанол, глицерол, какой-либо стерол или фенол. Гликозиды, имеющие важное медицинское значение, а именно влияющие на работу сердца (**сердечные гликозиды**), содержат в качестве агликонового компонента стероиды; так, из наперстянки и строфанта выделен гликозид **убаин** — ингибитор Na^+/K^+-АТРазы клеточных мембран. К числу гликозидов относится ряд антибиотиков, в частности **стрептомицин** (рис. 14.10).

Дезоксисахара

У дезоксисахаров одна из гидроксильных групп, присоединенных к кольцевой структуре, замещена на атом водорода. Они образуются при гидролизе ряда соединений, играющих важную роль в биологических процессах. Примером служит **дезоксирибоза** (рис. 14.11), входящая в состав нуклеиновых кислот (ДНК).

Другими примерами дезоксисахаров являются L-фукоза (рис. 14.17) — компонент ряда гликопротеинов и 2-дезоксиглюкоза — ингибитор метаболизма глюкозы.

Таблица 14.2. Физиологически важные гексозы

Сахар	Источник	Биологическая роль	Клиническое значение
D-Глюкоза	Фруктовые соки. Гидролиз крахмала, тростникового сахара, мальтозы и лактозы	«Сахар» организма. Переносится кровью, эффективно используется тканями	Появляется в моче (гликозурия) у больных сахарным диабетом из-за повышенного содержания глюкозы в крови (гипергликемия)
D-Фруктоза	Фруктовые соки. Мед. Гидролиз тростникового сахара и инулина (из иерусалимских артишоков)	Может превращаться в глюкозу в печени и кишечнике, с последующим использованием в этой форме	Наследственная нетолерантность к фруктозе приводит к накоплению фруктозы и гипогликемии
D-Галактоза	Гидролиз лактозы	Может превращаться в глюкозу в печени и затем использоваться в процессах метаболизма. Синтезируется в молочных железах, входит в состав лактозы молока. Компонент гликолипидов и гликопротеинов	Нарушение метаболических превращений галактозы приводит к развитию галактоземии и образованию катаракты
D-Манноза	Гидролиз растительных маннанов и камедей	Компонент многих гликопротеинов	

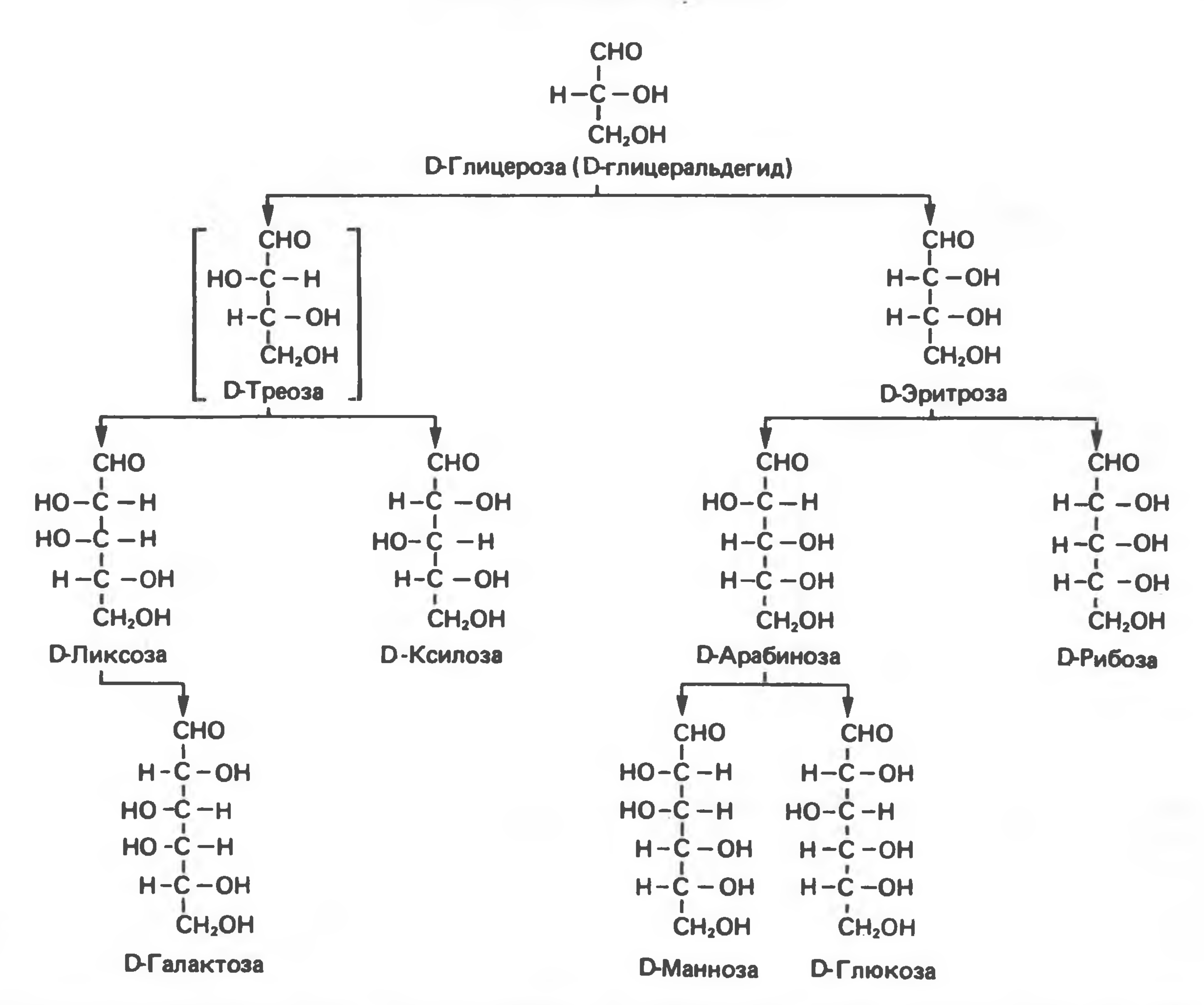


Рис. 14.7. Структурные соотношения между альдозами D-ряда. D-Треоза физиологической ценности не представляет. Построение ряда основано на добавлении CH_2O-единиц к –CHO-группе сахара.

Дигидроксиацетон: CH_2OH | C=O | CH_2OH

D-Ксилулоза: CH_2OH | C=O | HO–C–H | H–C–OH | CH_2OH

D-Рибулоза: CH_2OH | C=O | H–C–OH | H–C–OH | CH_2OH

D-Фруктоза: CH_2OH | C=O | HO–C–H | H–C–OH | H–C–OH | CH_2OH

D-Седогептулоза: CH_2OH | C=O | HO–C–H | H–C–OH | H–C–OH | H–C–OH | CH_2OH

Рис. 14.8. Кетозы (ряд примеров).

Рис. 14.9. α-D-Глюкуронат (слева) и β-L-идуронат (справа)

Рис. 14.11. 2-Дезокси-D-рибофураноза (β-форма).

Аминосахара (гексозамины)

Примерами аминосахаров служат D-глюкозамин (рис. 14.12), D-галактозамин и D-маннозамин — все эти вещества обнаружены в природе. Глюкозамин является компонентом гиалуроновой кислоты. Галактозамин (хондрозамин) входит в состав хондроитина (см. гл. 54).

Ряд антибиотиков (эритромицин, карбомицин) содержит в своем составе аминосахара. Считается, что аминосахара вносят существенный вклад в биологическую активность этих антибиотиков.

ДИСАХАРИДЫ

Дисахариды представляют собой сахара, состоящие из двух моносахаридных остатков, соединенных гликозидной связью (рис. 14.13). Их химическое название отражает название составляющих их моносахаридов. Физиологически важными дисахаридами являются мальтоза, сахароза, лактоза и трегалоза (табл. 14.3).

Гидролиз сахарозы приводит к образованию смеси, которую называют «инвертированным сахаром»: в ней преобладает сильно левовращающая фруктоза, которая инвертирует (меняет на обратный) знак вращения правовращающего раствора исходной сахарозы.

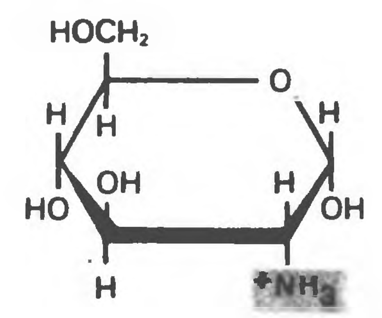


Рис. 14.12. Глюкозамин (2-амино-D-глюкопираноза) (α-форма). Галактозамин — 2-амино-D-галактопираноза. И глюкозамин, и галактозамин в виде N-ацетильных производных входят в состав более сложных углеводов, в частности, в составе гликопротеинов.

ПОЛИСАХАРИДЫ

К полисахаридам относятся следующие физиологически важные углеводы.

Крахмал. Моносахаридные остатки соединены в крахмале α-глюкозидными связями. Соединение такой структуры, образованное только остатками глюкозы, является гомополимером, его называют **глюкозаном** или **глюканом**. Это наиболее важный

Рис. 14.10. Стрептомицин (слева) и уабаин (справа).

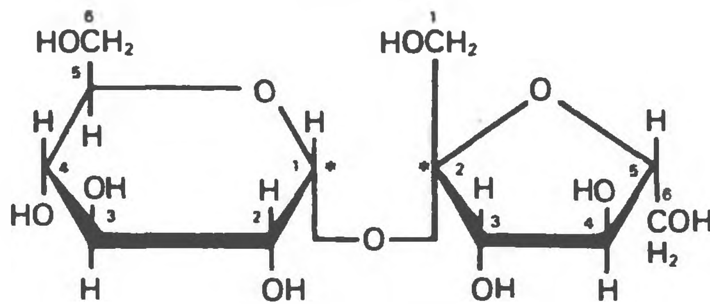
Мальтоза

0-α-D-Глюкопиранозил-(1 → 4)-α-D-глюкопираноза

Трегалоза

0-α-D-Глюкопиранозил-(1 → 1)-α-D-глюкопиранозид

Сахароза



0-α-D-Глюкопиранозил-(1 → 2)-β-D-фруктофуранозид

Целлобиоза

0-β-D-Глюкопиранозил-(1 → 4)-β-D-глюкопираноза

Лактоза

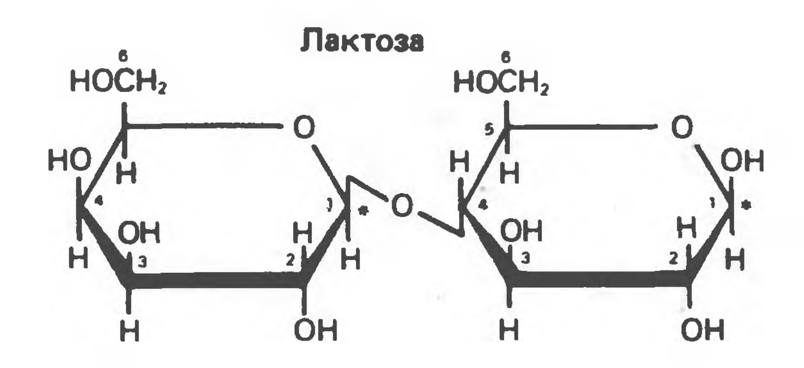


Рис. 14.13. Структура ряда важных дисахаридов. α- и β-форма различаются конфигурацией при аномерном атоме углерода (отмечен звездочкой). Если в гликозидной связи участвует аномерный углерод второго сахарного остатка, этот остаток называют гликозидом (фуранозидом или пиранозидом).

Таблица 14.3. Дисахариды

Сахар	Источник	Клиническое значение
Мальтоза	Продукт распада крахмала (при переваривании амилазой или гидролизе). Проростки злаков, солод	
Лактоза	Молоко. В период беременности может содержаться в моче	При понижении активности лактазы усвоение лактозы нарушается, что приводит к диарее и метеоризму
Сахароза	Тростниковый и свекловичный сахар. Сорго, ананас, морковь	При понижении активности сахаразы усвоение сахарозы нарушается, и в связи с этим наблюдаются диарея и метеоризм
Трегалоза	Грибы и дрожжи. Главный сахар в гемолимфе насекомых	

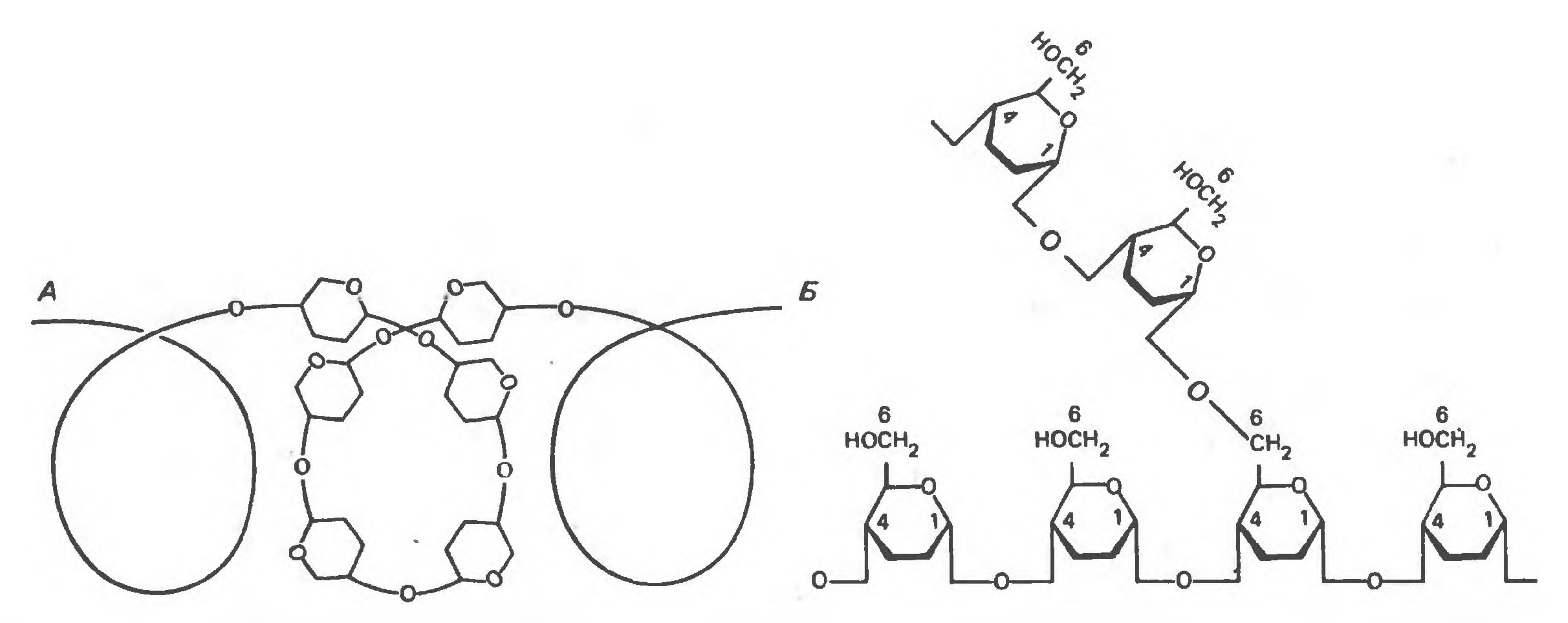


Рис. 14.14. Структура крахмала. *А* — амилоза с характерной для нее спиральной структурой; *Б* — амилопектин, образующий в точках ветвления связи типа 1→6.

А
НАРУЖНЫЕ УЧАСТКИ
ВНУТРЕННЯЯ ОБЛАСТЬ
R
Б
HOCH₂
CH₂

Рис. 14.15. Молекула гликогена. *А* — увеличенное изображение структуры в окрестности точки ветвления. *Б* — структура молекулы. Цифрами обозначены участки, образующиеся на эквивалентных стадиях роста макромолекулы. R — первый остаток глюкозы. Обычно ветвление носит более разнообразный характер, чем это показано на рисунке; отношение числа связей типа 1→4 к числу связей типа 1→6 колеблется от 12 до 18

вид пищевых углеводов; он содержится в злаках, картофеле, бобовых и в других растениях. Двумя главными компонентами крахмала являются **амилоза** (15—20%), имеющая неразветвленную спиральную структуру (рис. 14.14), и **амилопектин** (80—85%), образованный разветвленными цепями, каждая ветвь состоит из 24—30 остатков глюкозы, соединенных (1 → 4)-связями [в точках ветвления остатки соединены (1 → 6)-связями].

Гликоген (рис. 14.15) — полисахарид, в виде которого углеводы запасаются в организме животного. Его часто называют животным крахмалом. Гликоген характеризуется более разветвленной структурой, чем амилопектин, линейные отрезки цепи включают 11—18 остатков α-D-глюкопиранозы [соединенных α(1 → 4)-гликозидными связями], в точках ветвления остатки соединены α(1 → 6)-гликозидными связями.

Инулин — полисахарид, содержащийся в клубнях и корнях георгинов, артишоков и одуванчиков. При его гидролизе образуется фруктоза, следовательно он представляет собой фруктозан. Этот полисахарид в отличие от картофельного крахмала легко растворяется в теплой воде; его используют в физиологических исследованиях для определения скорости клубочковой фильтрации в почках.

Декстринами называют вещества, образующиеся при гидролизе крахмала. Название «остаточные декстрины» получили продукты, образующиеся на определенной стадии гидролиза.

Целлюлоза — главный компонент структурной основы растений. Она нерастворима в обычных растворителях и состоит из α-D-глюкопиранозных звеньев, соединенных β(1 → 4)-связями и образующих длинные вытянутые цепи, стабилизированные поперечными водородными связями. Многие млекопитающие, в том числе человек, не способны переваривать целлюлозу, так как их пищеварительная система не содержит гидролаз, расщепляющих β-связи. Поэтому целлюлозу можно рассматривать как значительный неиспользуемый пищевой резерв. В кишечнике жвачных и других травоядных животных имеются микроорганизмы, способные к ферментативному расщеплению β-связей, и для этих животных целлюлоза является важным источником пищевых калорий.

Хитин — важный структурный полисахарид беспозвоночных. Из него, в частности, построен наружный скелет ракообразных и насекомых. Структуру хитина составляют N-ацетил-D-глюкозаминовые звенья, соединенные β (1 → 4)-гликозидными связями (рис. 14.16).

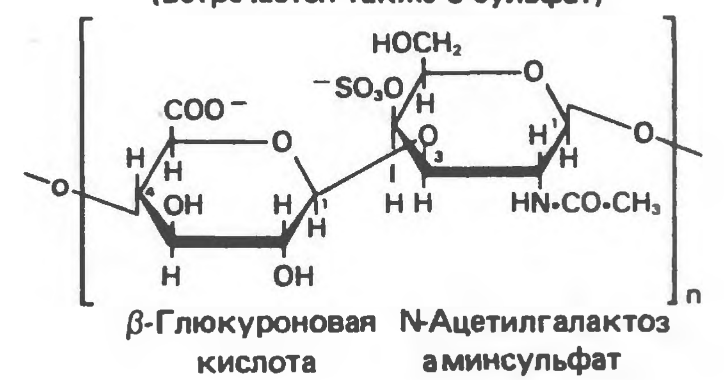
Гликозаминогликаны (мукополисахариды) состоят из цепей сложных углеводов, содержащих аминосахара и уроновые кислоты. Если эти цепи присоединены к белковой молекуле, соответствующее соедине-

Хитин

N-Ацетилглюкозамин N-Ацетилглюкозамин

Гиалуроновая кислота

β-Глюкуроновая кислота N-Ацетилглюкозамин



Гепарин

Сульфатированный глюкозамин Сульфатированная идуроновая кислота

Рис. 14.16. Структура некоторых сложных полисахаридов

ние называют **протеогликаном**. Гликозаминогликаны как основное скрепляющее вещество связаны со структурными компонентами, входящими в состав костей, а также с эластином и коллагеном. Их функция состоит в удержании большой массы воды и в заполнении межклеточного пространства. Они служат смягчающим и смазочным материалом для разного рода тканевых структур; выполнению

этих функций способствует большое число —OH-групп и отрицательных зарядов на их молекулах, что приводит к взаимному отталкиванию углеводных цепей, препятствующему их слипанию. Примерами служат **гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат** и **гепарин** (рис. 14.16), которые будут подробнее рассматриваться в гл. 54.

Гликопротеины (мукопротеины) содержатся в разного рода жидкостях и тканях, а также в клеточных мембранах (см. гл. 42 и 54). Они представляют собой сложные белки, содержащие углеводный компонент (количество его варьирует), который может состоять из коротких или длинных (до 15 звеньев), разветвленных или неразветвленных цепей. В состав этих цепей, которые обычно называют олигосахаридными цепями, входят

Гексозы

Манноза (Man) Галактоза (Gal)

Ацетилгексозамины

N-Ацетилглюкозамин (GlcNAc) N-Ацетилгалактозамин (GalNAc)

Пентозы

Арабиноза (Ara) Ксилоза (Xyl)

Метилпентозы

L-Фукоза (Fuc; рис. 14.17)

Сиаловые кислоты

N-Ацилпроизводные нейраминовой кислоты, например N-ацетилнейраминовая кислота (NeuAc; рис. 14.18), преобладающая среди сиаловых кислот.

Глюкоза в полностью сформированных (зрелых) гликопротеинах не обнаруживается (за исключением коллагена). Кроме того, гликопротеины, в отличие от гликозаминогликанов и протеогликанов, не содержат уроновых кислот.

Сиаловые кислоты являются N- или O-ацилпроизводными нейраминовой кислоты (рис. 14.18). **Нейраминовая кислота** представляет собой девятиуглеродный сахар, образованный из маннозамина (эпимера глюкозамина) и пирувата. Сиаловые кислоты входят в состав **гликопротеинов и ганглиозидов**.

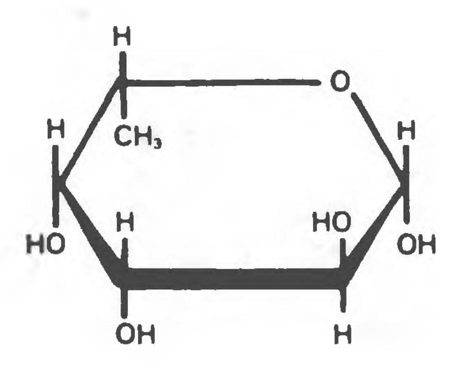


Рис. 14.17. β-L-Фукоза (6-дезокси-β-L-галактоза).

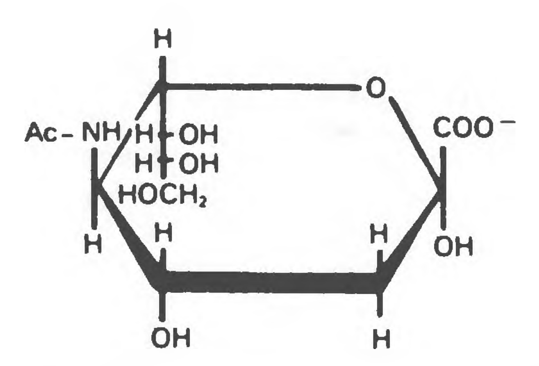


Рис. 14.18. Структура N-ацетилнейраминовой кислоты, одной из сиаловых кислот (Ac = CH_3-CO-).

УГЛЕВОДЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Липидная структура клеточной мембраны описана в гл. 15 и 42. Однако анализ компонентов, из которых состоят клеточные мембраны млекопитающих, указывает, что примерно 5% приходится на углеводы, входящие в состав гликопротеинов и гликолипидов. Присутствие углеводов на наружной поверхности клеточной мембраны (в совокупности образующих **гликокаликс**) было установлено путем использования растительных **лектинов** — белковых агглютининов, специфически связывающихся с некоторыми гликозильными остатками. Например, **конканавалин А** специфичен к α-глюкозильным и α-маннозильным остаткам.

Гликофорин — главный встроенный в мембрану (интегральный) гликопротеин эритроцитов человека. Он содержит 130 аминокислотных остатков и пронизывает липидную мембрану, при этом свободные фрагменты полипептида выступают как из наружной, так и из внутренней (цитоплазматической) поверхности. Углеводные цепи присоединены только к N-концевому фрагменту, находящемуся на наружной поверхности мембраны (см. гл. 42).

ЛИТЕРАТУРА

Advances in Carbohydrate Chemistry, Academic Press, 1945 — current.

Collins P. M. (ed.) Carbohydrates, Chapman and Hall, 1987.

Gook G. M. W., Stoddart R. W. Surface Carbohydrates of the Eukaryotic Cell, Academic Press, 1973.

Ferrier R. J., Collins P. M. Monosaccharide Chemistry, Penguin Books, 1972.

Hughes R. C. The complex carbohydrates of mammalian cell surfaces and their biological roles. Essays Biochem., 1975, **11**, 1.

Lindahl U., Höök M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 385.

Pigman W. W., Horton D. (eds) The Carbohydrates, Vols. 1A and 1B, Academic Press, 1972.

Sharon N. Lectins, Sci. Am. (June), 1977, **236**, 108.

Глава 15

Физиологически важные липиды

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Липиды — это гетерогенная группа соединений, непосредственно или опосредованно связанных с жирными кислотами. Их общим свойством является 1) относительная нерастворимость в воде и 2) растворимость в неполярных растворителях — эфире, хлороформе, бензоле. К липидам относятся жиры, масла, воска и родственные соединения.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Липиды являются важной составной частью пищевых продуктов не только вследствие высокой энергетической ценности, но также и потому, что в натуральных пищевых жирах содержатся жирорастворимые витамины и «незаменимые» жирные кислоты. Жир служит в организме весьма эффективным источником энергии либо при непосредственном использовании, либо потенциально — в форме запасов в жировой ткани. Он обеспечивает также теплоизоляцию, скапливаясь в подкожном слое и вокруг определенных органов; неполярные липиды служат электроизоляторами, обеспечивая быстрое распространение волн деполяризации вдоль миелинизированных нервных волокон. Содержание жира в нервной ткани особенно высоко. Комплексы жиров с белками (липопротеины) являются важными клеточными компонентами, присутствующими как в клеточной мембране, так и в митохондриях; они также служат средством транспортировки липидов в токе крови. Знание биохимии липидов необходимо для понимания многих областей современной биомедицины, например проблем ожирения, атеросклероза; важное значение имеет также понимание роли различных полиненасыщенных жирных кислот в рациональном питании и для поддержания здоровья.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

Приводим классификацию липидов, предложенную Блором (в несколько модифицированном виде).

А. Простые липиды: сложные эфиры жирных кислот с различными спиртами.

1. Жиры: сложные эфиры жирных кислот с глицеролом; если они находятся в жидком состоянии, их называют маслами.

2. Воска: сложные эфиры жирных кислот с одноатомными спиртами.

Б. Сложные липиды: сложные эфиры жирных кислот со спиртами, дополнительно содержащие и другие группы.

1. Фосфолипиды: липиды, содержащие помимо жирных кислот и спирта остаток фосфорной кислоты. В их состав часто входят азотистые основания и другие компоненты.

а. Глицерофосфолипиды: в роли спирта выступает глицерол.

б. Сфингофосфолипиды: спирт — сфингозин.

2. Гликолипиды (гликосфинголипиды): липиды, содержащие жирную кислоту, сфингозин и углеводный компонент.

3. Другие сложные липиды: сульфолипиды, аминолипиды. К этой категории можно отнести и липопротеины.

В. Предшественники и производные липидов. Сюда относятся жирные кислоты, глицерол, стероиды, прочие спирты (помимо глицерола и стеролов), альдегиды жирных кислот и кетоновые тела (см. гл. 28), углеводороды, жирорастворимые витамины и гормоны.

Поскольку ацилглицеролы (глицериды), холестерол и его эфиры не несут электрического заряда, их относят к **нейтральным липидам**.

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Жирные кислоты — это алифатические карбоновые кислоты, получаемые в основном из жиров и масел. В состав природных жиров обычно входят жирные кислоты с **четным числом** атомов углерода, поскольку они синтезируются из двухуглеродных единиц, образующих неразветвленную цепь углеродных атомов. Цепь может быть насыщенной (не содержа-

щей двойных связей) и ненасыщенной (содержащей одну или более двойных связей).

Номенклатура

Систематическое название жирной кислоты чаще всего образуется путем добавления к названию углеводорода окончания **-овая** (Женевская номенклатура). Насыщенные кислоты при этом имеют окончание **-ановая** (например, октановая), а ненасыщенные **-еновая** (например, октадеценовая — олеиновая кислота). Атомы углерода нумеруются, начиная от карбоксильной группы (содержащей атом углерода 1). Атом углерода, следующий за карбоксильной группой (углерод 2), называют также α-углеродом. Атом углерода 3 — это β-углерод, а углерод концевой метильной группы (углерод n) — ω-углерод. Для указания числа двойных связей и их положения были приняты различные соглашения, например Δ^9 означает, что двойная связь в молекуле жирной кислоты находится между атомами углерода 9 и 10; ω9 — двойная связь между девятым и десятым атомами углерода, если их отсчитывать с ω-конца. Широко используемые названия с указанием числа атомов углерода, числа двойных связей и их положения приведены на рис. 15.1. В жирные кислоты животных организмов в процессе метаболизма могут вводиться дополнительные двойные связи, но всегда **между уже имеющейся двойной связью (например ω 9, ω 6 или ω 3) и карбоксильным углеродом**; это приводит к разделению жирных кислот на 3 семейства животного происхождения — ω 3, ω 6 или ω 9.

18:1;9 *или* Δ^9 18:1

$$\overset{18}{C}H_3(CH_2)_7\overset{10}{C}H=\overset{9}{C}H(CH_2)_7\overset{1}{C}OOH$$

или

ω9,C18:1 *или* n-9, 18:1

$$\underset{n}{\overset{\omega}{C}H_3}\overset{2}{C}H_2\overset{3}{C}H_2\overset{4}{C}H_2\overset{5}{C}H_2\overset{6}{C}H_2\overset{7}{C}H_2\overset{8}{C}H_2\overset{9}{C}H=CH(CH_2)_7COOH$$

Рис. 15.1. Олеиновая кислота (n — 9; читается: «n минус 9»).

Насыщенные жирные кислоты

Насыщенные жирные кислоты являются членами гомологического ряда, начинающегося с уксусной кислоты. Примеры приведены в табл. 15.1.

Существуют и другие члены ряда, с большим числом углеродных атомов, они встречаются в первую очередь в восках. Было выделено — как из растительных, так и из животных организмов — несколько жирных кислот с разветвленной цепью.

Ненасыщенные жирные кислоты (табл. 15.2)

Их подразделяют в соответствии со степенью ненасыщенности.

А. Мононенасыщенные (моноэтеноидные, моноеновые) кислоты.

Б. Полиненасыщенные (полиэтеноидные, полиеновые) кислоты.

В. Эйкозаноиды. Эти соединения, образующиеся из эйкоза-(20-С)-полиеновых жирных кислот, под-

Таблица 15.1. Насыщенные жирные кислоты

Название	Число атомов углерода	
Муравьиная[1]	1	Принимает участие в метаболизме C_1-соединений (формиат)
Уксусная	2	Главный конечный продукт углеводного брожения у жвачных животных
Пропионовая	3	Конечный продукт углеводного брожения у жвачных животных
Масляная	4	Присутствуют в небольших количествах в некоторых жирах (особенно в сливочном масле). Конечные продукты углеводного брожения у жвачных животных
Валериановая	5	
Капроновая	6	
Каприловая (октановая)	8	Присутствуют в малых количествах во многих жирах (включая сливочное масло), особенно в жирах растительного происхождения
Каприновая (декановая)	10	
Лауриновая	12	Спермацетовый жир, корица, семена пальмы, кокосовое масло, лавровый лист
Миристиновая	14	Мускатный орех, семена пальмы, кокосовое масло, мирт
Пальмитиновая	16	Встречаются во всех животных и растительных жирах
Стеариновая	18	
Арахидиновая	20	Арахисовое масло
Бегеновая	22	Семена растений
Лигноцеровая	24	Цереброзиды, арахисовое масло

[1] Строго говоря, не является алкильным производным.

Таблица 15.2. Ненасыщенные жирные кислоты, имеющие физиологическое и пищевое значение

Число атомов углерода, число и положение двойных связей	Ряд	Название	Систематическое наименование	Распространение
		Моноеновые кислоты (одна двойная связь)		
16:1; 9	ω 7	Пальмитолеиновая	*цис*-9-гексадеценовая	Почти во всех жирах
18:1; 9	ω 9	Олеиновая	*цис*-9-октадеценовая	Жирная кислота, которая, по-видимому, наиболее часто встречается в природных жирах
18:1; 9	ω 9	Элаидиновая	*транс*-9-октадеценовая	Жиры жвачных и жиры, подвергнутые гидрогенизации
22:1; 13	ω 9	Эруковая	*цис*-13-докозеновая	Рапсовое и горчичное масло
24:1; 15	ω 9	Нервоновая	*цис*-15-тетракозеновая	В цереброзидах
		Диеновые кислоты (две двойные связи)		
18:2; 9, 12	ω 6	Линолевая	полностью *цис*-9, 12-октадекадиеновая	Пшеница, арахис, семена хлопчатника, соя и многие растительные масла
		Триеновые кислоты (три двойные связи)		
18:3; 6, 9, 12	ω 6	γ-Линоленовая	полностью *цис*-6, 9, 12-октадекатриеновая	Некоторые растения (розовое масло), минорная жирная кислота у животных
18:3; 9, 12, 15	ω 3	α-Линоленовая	полностью *цис*-9, 12, 15-октадекатриеновая	Часто обнаруживается вместе с линолевой кислотой, особенно в льняном масле
		Тетраеновые кислоты (четыре двойные связи)		
20:4; 5, 8, 11, 14	ω 6	Арахидоновая	полностью *цис*-5, 8, 11, 14-эйкозатетраеновая	Обнаруживается вместе с линолевой кислотой, особенно в арахисовом масле; важный компонент фосфолипидов животных
		Пентаеновые кислоты (пять двойных связей)		
20:5; 5, 8, 11, 14, 17	ω 3	Тимнодоновая	полностью *цис*-5, 8, 11, 14, 17-эйкозапентаеновая	Важный компонент рыбьего жира (из печени трески)
22:5; 7, 10, 13, 16, 19	ω 3	Клупанодоновая	полностью *цис*-7, 10, 13, 16, 19-докозапентаеновая	Рыбий жир, фосфолипиды мозга
		Гексаеновые кислоты (шесть двойных связей)		
22:6; 4, 7, 10, 13, 16, 19	ω 3	Цервоновая	полностью *цис*-4, 7, 10, 13, 16, 19-докозагексаеновая	Рыбий жир, фосфолипиды мозга

разделяются на **простаноиды** и **лейкотриены (ЛТ)**. Простаноиды включают **простагландины (ПГ), простациклины (ПГ-I)** и **тромбоксаны (ТО)**. Иногда термин простагландины употребляется в менее строгом смысле и означает все простаноиды.

Простагландины были первоначально обнаружены в семенной жидкости, но затем найдены в составе практически всех тканей млекопитающих; они обладают целым рядом важных физиологических и фармакологических свойств. Они синтезируются in vivo путем циклизации участка в центре углеродной цепи 20-С (эйкозановых) полиненасыщенных жирных кислот (например, арахидоновой кислоты) с образованием циклопентанового кольца (рис. 15.2). Родственная серия соединений, **тромбоксаны**, обнаруженные в тромбоцитах, содержат циклопентановое кольцо, в которое включен атом кислорода (оксановое кольцо) (рис. 15.3). Три различные эйкозановые жирные кислоты приводят к образованию трех групп эйкозаноидов, различающихся числом двойных связей в боковых цепях — $ПГ_1$, $ПГ_2$ и $ПГ_3$. К кольцу могут быть присоединены различные группы, дающие на-

Рис. 15.2. Простагландин E_2 (PG E_2).

Рис. 15.3. Тромбоксан A_2.

чало нескольким разным типам простагландинов и тромбоксанов, которые обозначаются А, В и т. д. Например, простагландин Е-типа (ПГ-E_2) содержит кетогруппу в положении 9, тогда как в простагландине F-типа в этом же положении стоит гидроксильная группа. **Лейкотриены** являются третьей группой эйкозаноидных производных, они образуются не путем циклизации жирных кислот, а в результате действия ферментов липоксигеназного пути (рис. 15.4). Они были впервые найдены в лейкоцитах и характеризуются наличием трех сопряженных двойных связей.

Рис. 15.4. Лейкотриен A_4.

Г. Другие ненасыщенные жирные кислоты. В материалах биологического происхождения были найдены и многие другие жирные кислоты, содержащие, в частности, гидроксильные группы (рицинолевая кислота) или циклические группы.

Цис-транс-изомерия ненасыщенных жирных кислот

Углеродные цепи насыщенных жирных кислот имеют форму зигзагообразной линии, когда они вытянуты (как это имеет место при низких температурах). При более высоких температурах происходит поворот вокруг ряда связей, приводящий к укорочению цепей,— именно поэтому при повышении температуры биомембраны становятся тоньше. У ненасыщенных жирных кислот наблюдается **геометрическая изомерия**, обусловленная различием в ориентации атомов или групп относительно двойной связи. Если ацильные цепи располагаются с одной стороны от двойной связи, образуется *цис*-конфигурация, характерная, например, для олеиновой кислоты; если же они располагаются по разные стороны, то молекула находится в *транс*-конфигурации, как в случае элаидиновой кислоты — изомера олеиновой кислоты (рис. 15.5). Природные полиненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты почти все имеют *цис*-

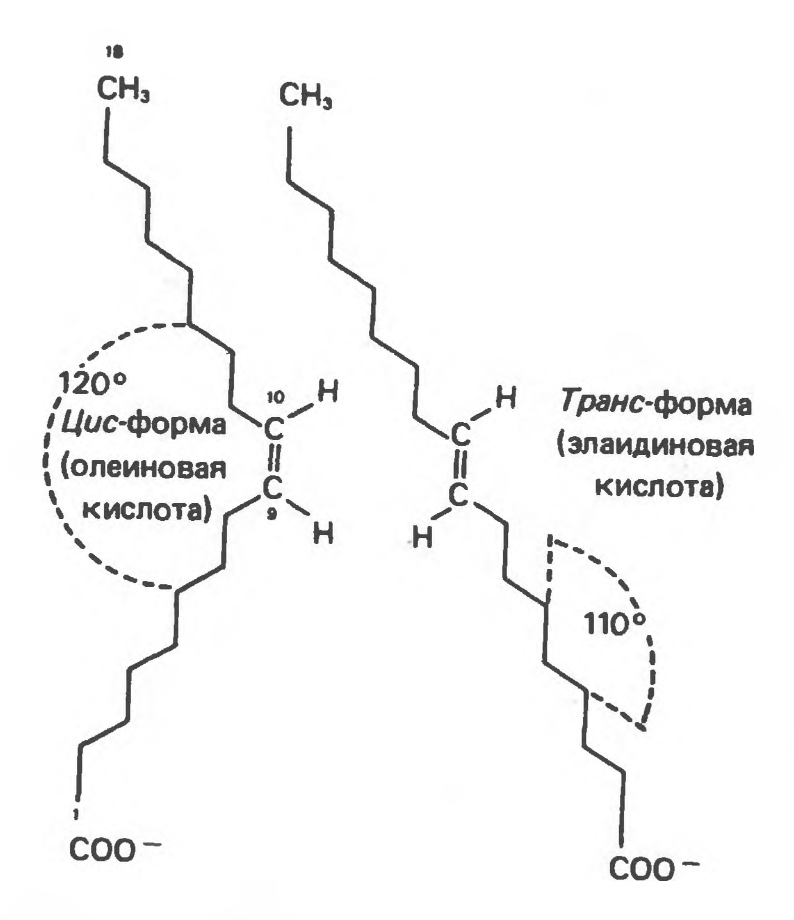


Рис. 15.5. Геометрическая изомерия жирных кислот (Δ°, 18:1) (олеиновая и элаидиновая кислоты).

конфигурацию; на участке, где находится двойная связь, молекула «согнута» и образует угол в 120°. Таким образом, олеиновая кислота имеет форму буквы Г, тогда как элаидиновая кислота на участке, содержащем двойную связь, сохраняет «линейную» *транс*-конфигурацию. Увеличение числа *цис*-двойных связей в жирных кислотах ведет к увеличению числа возможных пространственных конфигураций молекулы. Это может оказывать большое влияние на упаковку молекул в мембранах, а также на положение молекул жирных кислот в составе более сложных молекул, таких, как фосфолипиды. Наличие двойных связей в *транс*-конфигурации изменяет эти пространственные соотношения. Жирные кислоты в *транс*-конфигурации присутствуют в составе некоторых пищевых продуктов. Большинство из них образуется как побочные продукты в процессе гидрогенизации, благодаря которому жирные кислоты переходят в насыщенную форму; таким способом, в частности, добиваются «затвердевания» природных масел при производстве маргарина. Кроме того, еще некоторое небольшое количество *транс*-кислот поступает с животным жиром — он содержит *транс*-кислоты, образовавшиеся под действием микроорганизмов, присутствующих в рубце жвачных животных.

Спирты

К числу спиртов, входящих в состав липидов, относятся глицерол, холестерол и высшие спирты (на-

пример, цетиловый спирт $C_{16}H_{33}OH$), которые обычно обнаруживаются в восках, а также полиизопреноидный спирт долихол (рис. 15.27).

Альдегиды жирных кислот

Жирные кислоты могут быть восстановлены в альдегиды. Эти соединения обнаруживаются в природных жирах как в свободном, так и в связанном состоянии.

Физиологически важные свойства жирных кислот

Физические свойства липидов организма в основном зависят от длины углеродных цепей и степени ненасыщенности соответствующих жирных кислот. Так, точка плавления жирных кислот с четным числом атомов углерода повышается с ростом длины цепи и понижается при увеличении степени ненасыщенности. Триацилглицерол, в котором все три цепи являются насыщенными жирными кислотами, содержащими не менее 12 атомов углерода в каждой, является при температуре тела твердым веществом; если же все три остатка жирных кислот относятся к типу 18:2, то соответствующий триацилглицерол остается жидким при температуре ниже 0° С. На практике природные ацилглицеролы содержат смесь жирных кислот, обеспечивающую выполнение определенной функциональной роли. Мембранные липиды, которые должны находиться в жидком состоянии, являются более ненасыщенными по сравнению с запасными липидами. В тканях, подвергающихся охлаждению — во время зимней спячки или в экстремальных условиях,— липиды оказываются более ненасыщенными.

ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛЫ[1] (триглицериды)

Триацилглицеролы — так называемые нейтральные жиры — являются сложными эфирами, образованными спиртом глицеролом и жирными кислотами. В природных жирах доля молекул триацилглицерола, в которых все три эфирные связи образованы остатками одной и той же жирной кислоты, очень невелика. Почти все они являются смешанными **ацилглицеролами**.

Если в молекуле, изображенной на рис. 15.6, все три R-группы представлены стеариновой кислотой, то соединение называется тристеарином. Примеры смешанных ацилглицеролов представлены на рис. 15.7 и 15.8.

[1] Согласно терминологии, принятой Международным союзом общей и прикладной химии (IUPAC) и Международным союзом биохимиков (IUB), моноглицериды, диглицериды и триглицериды следует называть моноацилглицеролами, диацилглицеролами и триацилглицеролами соответственно.

$$\begin{array}{l} {}^{1}CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_1 \\ R_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-{}^{2}CH \\ {}^{3}CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_2 \end{array}$$

Рис. 15.6. Триацилглицерол.

$$\begin{array}{l} {}^{1}CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-C_{17}H_{35} \\ C_{15}H_{31}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-{}^{2}CH \\ {}^{3}CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-C_{17}H_{35} \end{array}$$

Рис. 15.7. 1,3-Дистеаропальмитин.

$$\begin{array}{l} {}^{1}CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-C_{17}H_{35} \\ C_{17}H_{35}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-{}^{2}CH \\ {}^{3}CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-C_{15}H_{31} \end{array}$$

Рис. 15.8. 1,2-Дистеаропальмитин.

Номенклатура

Для того чтобы однозначным образом пронумеровать атомы углерода в молекуле глицерола, предложена система стереохимической нумерации (обозначается *sn*). Например: 1,2-дистеарил-3-пальмитил-*sn*-глицерол (см. проекционную формулу на рис. 15.9). Следует ясно представлять себе, что углероды 1 и 3 в молекуле глицерола, если учитывать их пространственное расположение, неидентичны. Ферменты их легко различают и почти всегда специфичны только к одному из них: так, глицерокиназа фосфорилирует глицерол в положении *sn*-3, в результате образуется глицерол-3-фосфат, но не глицерол-1-фосфат.

В тканях встречаются также и частичные ацилглицеролы — моно- или диацилглицерины, в которых глицерол этерифицирован только одной или двумя жирными кислотами. Они представляют интерес как промежуточные соединения, образующиеся в ходе синтеза или гидролиза триацилглицеролов.

$$\begin{array}{l} H_2{}^{1}C-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_1 \\ R_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O \blacktriangleright {}^{2}C \blacktriangleleft H \\ H_2{}^{3}C-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_3 \end{array}$$

Рис. 15.9. Триацил-*sn*-глицерол.

ФОСФОЛИПИДЫ

К фосфолипидам относятся 1) фосфатидная кислота и фосфатидилглицеролы, 2) фосфатидилхолин, 3) фосфатидилэтаноламин, 4) фосфатидилинозитол, 5) фосфатидилсерин, 6) лизофосфолипиды, 7) плазмалогены и 8) сфингомиелины.

Фосфатидная кислота и фосфатидилглицеролы

Фосфатидная кислота является важным промежуточным соединением в ходе синтеза триацилглицеролов и фосфолипидов, но в тканях содержится в незначительных количествах (рис. 15.10).

Рис. 15.10. Фосфатидная кислота.

Кардиолипин — фосфолипид, содержащийся в мембранах митохондрий. Он образуется из **фосфатидилглицерола** (рис. 15.11).

Фосфатидилхолин (лецитин)

Лецитины, как и простые жиры, содержат глицерол и жирные кислоты, но в их состав еще входят фосфорная кислота и холин. Лецитины широко представлены в клетках различных тканей, они выполняют как метаболические, так и структурные функции в мембранах. Дипальмитиллецитин — очень эффективный поверхностно-активный агент, снижающий поверхностное натяжение и тем самым препятствующий слипанию внутренних поверхностей дыхательных путей в легких. Его отсутствие в легких

Холин

Рис. 15.12. 3-Фосфатидилхолин.

недоношенных новорожденных приводит к развитию **синдрома дыхательной недостаточности**. Большинство фосфолипидов содержит насыщенный ацильный радикал в положении C_1 и ненасыщенный радикал в положении C_2 (рис. 15.12).

Фосфатидилэтаноламин (кефалин)

Кефалины отличаются от лецитинов только тем, что у них холин заменен этаноламином (рис. 15.13).

Этаноламин

Рис. 15.13. 3-Фосфатидилэтаноламин.

Фосфатидилинозитол

Инозитол в этом соединении представлен одним из стереоизомеров — миоинозитолом (рис. 15.14). Фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат является важным компонентом фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран; при стимуляции соответствующим гормоном он расщепляется на **диацилглицерол** и **инозитолтрифосфат** — оба этих соединения

Фосфатидилглицерол

Рис. 15.11. Дифосфатидилглицерол (кардиолипин).

Рис. 15.14. 3-Фосфатидилинозитол.

действуют как внутриклеточные, или вторые посредники.

Фосфатидилсерин

В тканях находится также родственный кефалину фосфолипид, содержащий вместо этаноламина остаток серина (рис. 15.15). Кроме того, были выделены фосфолипиды, содержащие остаток треонина.

Рис. 15.15. 3-Фосфатидилсерин.

Лизофосфолипиды

Эту группу соединений образуют фосфоацилглицеролы, содержащие только один ацильный радикал. Примером служит лизолецитин, играющий важную роль в метаболизме фосфолипидов (рис. 15.16).

Рис. 15.16. Лизолецитин.

Плазмалогены

На долю этих соединений приходится до 10% фосфолипидов мозга и мышечной ткани. В структурном отношении они родственны фосфатидилэтаноламину, но имеют при атоме углерода C_1 простую эфирную связь, а не сложноэфирную, как большинство других ацилглицеролов. Алкильным радикалом в плазмалогенах обычно является ненасыщенный спирт (рис. 15.17).

В некоторых случаях этаноламин замещают холин, серин или инозитол.

Рис. 15.17. Плазмалоген (фосфатидальэтаноламин).

Сфингомиелины

Сфингомиелины в больших количествах встречаются в нервной ткани. При гидролизе сфингомиелинов образуются жирная кислота, фосфорная кислота, холин и сложный аминоспирт **сфингозин** (рис. 15.18). Глицерола в составе этих соединений нет. Соединение сфингозина с жирной кислотой получило название **церамид**, он обнаружен в составе гликолипидов (см. ниже).

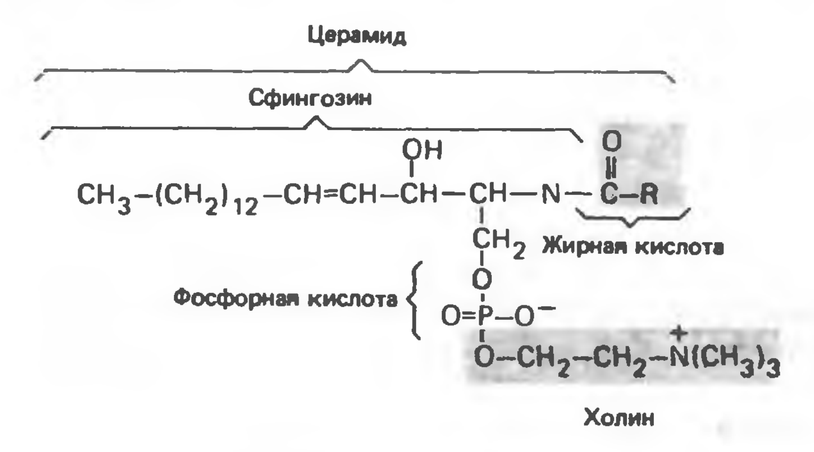


Рис. 15.18. Сфингомиелин.

ГЛИКОЛИПИДЫ (ГЛИКОСФИНГОЛИПИДЫ)

Гликолипиды широко представлены в тканях, особенно в нервной ткани, в частности в ткани мозга. Они локализованы преимущественно на наружной поверхности плазматической мембраны, где их углеводные компоненты входят в число других **углеводов клеточной поверхности**.

Главной формой гликолипидов в животных тканях являются гликосфинголипиды. Они содержат церамид, а также один или несколько остатков сахаров. Двумя простейшими соединениями этой группы являются **галактозилцерамид** и **глюкозилцерамид**. Галактозилцерамид — главный гликосфинголипид мозга и других нервных тканей, но в небольших ко-

Сфингозин

$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH-NH-C(=O)-CH(OH)-(CH_2)_{21}-CH_3$

Жирная кислота (напр., цереброновая кислота)

Галактоза

Рис. 15.19. Структура галактозилцерамида (галактоцереброзида, R = H) и сульфогалактозилцерамида (сульфатида. R = SO_4^{2-}).

личествах он встречается и во многих других тканях. В его состав обычно входят различные C_{24}-жирные кислоты. Галактозилцерамид (рис. 15.19) может превращаться в сульфогалактозилцерамид (классический **сульфатид**), который в больших количествах содержится в миелине. Простые гликосфинголипиды в тканях, отличных от нервной, представлены главным образом глюкозилцерамидом; в небольших количествах он имеется и в ткани мозга. Более сложными гликосфинголипидами являются **ганглиозиды**, образующиеся из глюкозилцерамида. Ганглиозид — это гликосфинголипид, дополнительно содержащий одну или несколько молекул сиаловой кислоты. В тканях человека доминирующей сиаловой кислотой является нейраминовая кислота (NeuAc, см. гл. 14). Ганглиозиды в больших количествах находятся в нервной ткани. Они, по-видимому, выполняют рецепторные и другие функции. Простейшим ганглиозидом, встречающимся в тканях, является G_{M3}; он содержит церамид, одну молекулу глюкозы, одну молекулу галактозы и одну молекулу NeuAc. В данном сокращении G означает ганглиозид (ganglioside), M — моносиаловое соединение (содержащее одну молекулу сиаловой кислоты), а индекс 3 — условный номер, присвоенный на основе положения при хроматографическом разделении. Структура более сложного ганглиозида G_{M1}, образующегося из G_{M3}, показана на рис. 15.20. G_{M1} представляет значительный биологический интерес, поскольку известно, что в эпителии кишечника человека он является рецептором холерного токсина. Другие ганглиозиды содержат от одной до пяти молекул сиаловой кислоты: их называют ди-, трисиалоганглиозиды и т. д.

СТЕРОИДЫ

Стероиды часто обнаруживаются в ассоциации с жирами. Их можно отделить от жира путем омыления[1] (они попадают в «неомыляемую» фракцию). Все стероиды содержат однотипное циклическое ядро, сходное с молекулой фенантрена (кольца A, B и C), с которым соединено циклопентановое кольцо (D). Нумерация атомов углерода в стероидном ядре приведена на рис. 15.21.

Важно иметь в виду, что простое гексагональное кольцо в структурных формулах стероидов — это не бензольное кольцо, а полностью насыщенное шестиуглеродное кольцо, в котором все валентности

[1] **Омылением** называется гидролиз жира щелочью. Продуктами омыления являются глицерол и щелочные соли жирных кислот, которые называют **мылами**.

Церамид — Глюкоза — Галактоза — N-Ацетилгалактозамин — Галактоза
(Ацил-сфингозин) | NeuAc (к галактозе)

или

Cer — Glc — Gal — GalNAc — Gal
| NeuAc (к Gal)

Рис. 15.20. G_{M1}-Ганглиозид (моносиалоганглиозид).

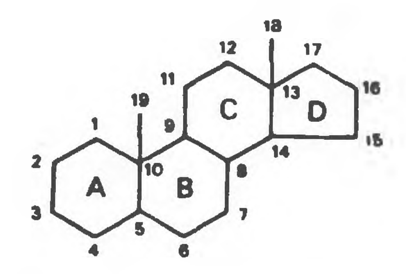


Рис. 15.21. Стероидное ядро.



Рис. 15.22. Конформации стереоизомеров.

насыщены атомами водорода (или, возможно, какими-то другими группами). Метильные боковые цепи обозначаются в виде черточек, у которых дальний (метильный) конец остается свободным. Обычно метильные группы находятся в положениях 10 и 13 (атомы углерода в составе этих групп имеют номера 19 и 18), боковая цепь присоединена в положении 17 (как в молекуле холестерола). Если соединение содержит одну или несколько гидроксильных групп и не содержит карбонильных или карбоксильных групп, это соединение называют **стеролом** и его полное название оканчивается на **ол**.

Стереохимические аспекты

Благодаря сложному строению и асимметрии молекулы стероиды имеют много потенциальных стереоизомеров. Каждое из шестиуглеродных колец стероидного ядра может принимать две различные пространственные конформации — конформацию «кресла» или конформацию «лодки» (рис. 15.22).

В природных стероидах практически все кольца имеют конформацию «кресла» вследствие большей устойчивости этой конформации. По отношению друг к другу кольца могут находиться в *цис*- или *транс*-положении (рис. 15.23).

Взаиморасположение колец A и B в природных стероидах может соответствовать и *цис*-, и *транс*-типу. Кольца B и C расположены по типу *транс*, так же как и кольца C и D (исключением служат сердечные гликозиды и стероиды из яда жаб). Связи с присоединенными группами, расположенными выше плоскости кольца, изображаются сплошными и более жирными линиями (β), а связи с группами, находящимися ниже плоскости кольца, обозначаются пунктирными линиями (α). В 5α-стероиде А-кольцо всегда находится в *транс*-положении по отношению к кольцу B, а в 5β-стероиде — в *цис*-положении. Метильные группы, присоединенные к атомам C_{10} и C_{13}, всегда находятся в β-конфигурации.

Холестерол

Холестерол находится во всех клетках организма, особенно много его в нервной ткани. Он является одним из главных компонентов плазматической мембраны и липопротеинов плазмы; часто находится в форме эфиров жирных кислот и служит исходным соединением для синтеза всех стероидов, функ-

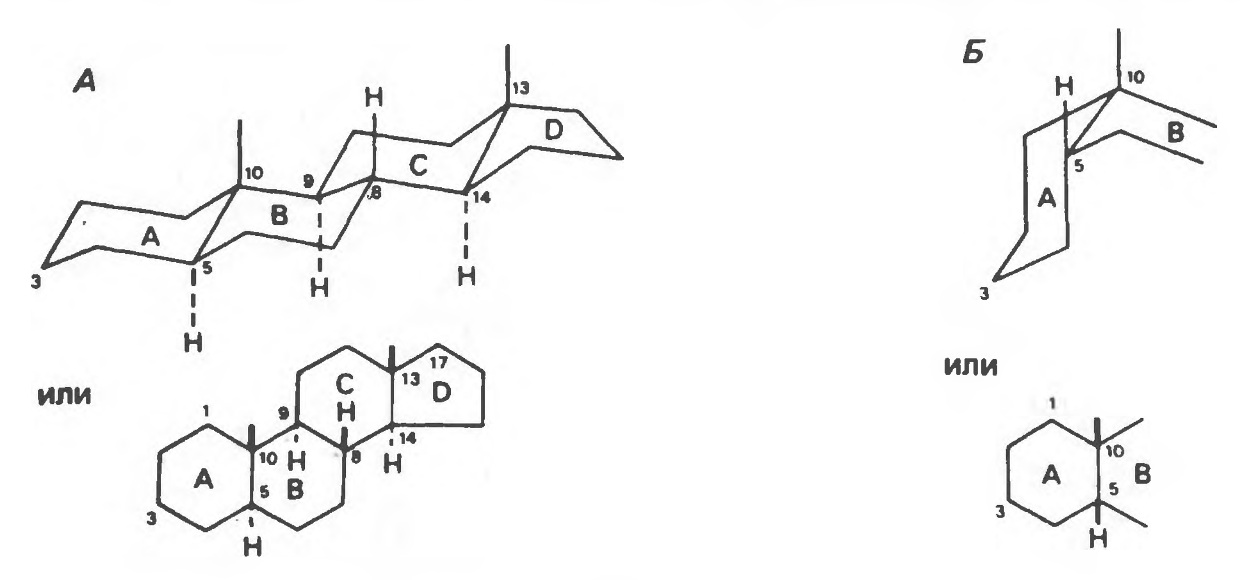


Рис. 15.23. Обобщенное стероидное ядро; *А* — полностью *транс*-конфигурация соседних колец; *Б* — *цис*-конфигурация колец A и B.

Рис. 15.24. Холестерол.

ционирующих в организме. Холестерол находится в животных, но не в растительных жирах. Его химическое название 3-гидрокси-5,6-холестен (рис. 15.24).

Эргостерол

Эргостерол содержится в растениях и дрожжах, он важен тем, что является предшественником витамина D (рис. 15.25). После облучения ультрафиолетовым светом он приобретает противорахитное действие (при раскрытии кольца B).

Копростерол

Копростерол (копростанол) находится в составе фекалий и образуется в результате восстановления бактериями кишечной микрофлоры двойной связи в холестероле между атомами C_5 и C_6.

Другие важные стеролы и стероиды

К ним относятся желчные кислоты, гормоны коры надпочечников, половые гормоны, витамины группы D, сердечные гликозиды, растительные ситостеролы и некоторые алкалоиды.

Полипреноидные соединения

Хотя они не являются стеролами, но в известной мере близки к последним, поскольку так же, как и холестерол (см. рис. 27.3), образованы 5-углеродными изопреноидными звеньями (рис. 15.26). К ним относятся **убихинон** (см. с. 126) — компонент дыхательной

Рис. 15.25. Эргостерол.

$$-CH{=}\underset{}{\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}}{-}CH{=}CH-$$

Рис. 15.26. Изопреноидная единица.

цепи митохондрий, и длинноцепочечный спирт **долихол** (рис. 15.27), принимающий участие в синтезе гликопротеинов, а именно в присоединении углеводных остатков к остаткам аспарагина в цепи полипептида (см. гл. 54). Изопреноидные соединения растительного происхождения включают каучук, камфору, жирорастворимые витамины A, D, E и K и β-каротин (провитамин A).

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Перекисное окисление (**автоокисление**) липидов при контакте с кислородом не только приводит в негодность пищевые продукты (**прогоркание**), но и вызывает также повреждение тканей in vivo, способствуя развитию опухолевых заболеваний. Повреждающее действие инициируется свободными радикалами ($ROO^\bullet$, $RO^\bullet$, $OH^\bullet$), возникающими в период образования перекисей жирных кислот, содержащих двойные связи, чередующиеся с метиленовыми мостиками (такое чередование имеется в природных полиненасыщенных жирных кислотах) (рис. 15.28). Перекисное окисление липидов является цепной реакцией, обеспечивающей расширенное воспроизводство свободных радикалов, которые инициируют дальнейшее распространение перекисного окисления. Весь процесс можно представить следующим образом.

1) Инициация: образование $R^\bullet$ из предшественника

$$ROOH + \text{металл}^{(n)+} \rightarrow ROO^\bullet + \text{металл}^{(n-1)+} + H^+$$

2) Развитие реакции:

$$R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$$
$$ROO^\bullet + RH \rightarrow ROOH + R^\bullet \text{ и т. д.}$$

3) Терминация (прекращение реакции):

$$ROO^\bullet + ROO^\bullet \rightarrow ROOR + O_2$$
$$ROO^\bullet + R^\bullet \rightarrow ROOR$$
$$R^\bullet + R^\bullet \rightarrow RR$$

Поскольку гидроперекись ROOH выступает как предшественник в процессе инициации, перекисное окисление липидов является разветвленной цепной реакцией, потенциально способной вызвать значите-

Рис. 15.27. Долихол (C_{95}-спирт).

Рис. 15.28. Перекисное окисление липидов. Реакция инициируется светом или ионами металлов. Малоновый диальдегид, образующийся только из жирных кислот с тремя и более двойными связями, используется как показатель перекисного окисления липидов вместе с этаном, образующимся в результате отщепления концевого двухуглеродного фрагмента ω 3-жирных кислот, и пентаном, образующимся при отщеплении концевого пятиуглеродного фрагмента ω 6-жирных кислот.

льные повреждения. Для регулирования процесса перекисного окисления жиров и человек, и природа используют **антиоксиданты**. В пищевые продукты с этой целью добавляют пропилгаллат, бутилированный гидроксианизол и бутилированный гидрокситолуол. К природным антиоксидантам относятся жирорастворимый витамин Е (токоферол), а также водорастворимые ураты и витамин С. β-Каротин является антиоксидантом только при низких значениях P_{O_2}. Антиоксиданты распадаются на два класса: 1) превентивные антиоксиданты, снижающие скорость инициации цепной реакции, и 2) гасящие (прерывающие цепь) антиоксиданты, препятствующие развитию цепной реакции. К первым относятся каталаза и другие пероксидазы, разрушающие ROOH, и агенты, образующие хелатные комплексы с металлами — ДТПА (диэтилентриаминпентаацетат) и ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). В качестве прерывающих цепь антиоксидантов часто выступают фенолы или ароматические амины. В условиях in vivo главными прерывающими цепь антиоксидантами являются супероксиддисмутаза (см. с. 126), которая в водной фазе улавливает супероксидные свободные радикалы ($O_2^{\bar{\cdot}}$), а также витамин Е, улавливающий свободные радикалы $ROO^{\cdot}$ в липидной фазе, и, возможно, мочевая кислота.

Перекисное окисление in vivo катализируется также гемовыми соединениями и **липоксигеназами**, на-

Рис. 15.29. α-Токоферол.

ходящимися в составе тромбоцитов, лейкоцитов и т. д.

Витамин Е (α-токоферол)

Существует несколько природных токоферолов. Все они являются 6-гидроксихроманами или токолами с изопреноидными заместителями (рис. 15.29). α-Токоферол наиболее широко распространен и имеет наибольшую биологическую активность как витамин.

Витамин Е выполняет по крайней мере две метаболические функции. Во-первых, он служит наиболее сильнодействующим природным жирорастворимым **антиоксидантом** и, во-вторых, выполняет специфическую, хотя и не до конца понятную, роль **в метаболизме селена**.

Витамин Е, по всей видимости, является первым эшелоном защиты клеточных и субклеточных мембранных фосфолипидов от перекисного окисления. Фосфолипиды митохондрий, эндоплазматического ретикулума и плазматических мембран обладают специфическим сродством к α-токоферолу, поэтому витамин, по-видимому, концентрируется в составе этих мембран. Токоферолы действуют как антиоксиданты, прерывающие цепи окисления благодаря их способности переносить фенольный водород на пероксидный радикал (рис. 15.30). Феноксирадикал является резонансно-стабилизированной и относительно нереакционноспособной структурой, за исключением его взаимодействия с другими пероксидными радикалами. Таким образом, α-токоферол почти не вовлекается в процесс цепной реакции окисления; при окислении хроманового кольца и боковой цепи α-токоферола образуется продукт, не являющийся свободным радикалом (рис. 15.31). Этот продукт образует конъюгат с глюкуроновой кислотой и экскретируется с желчью. Антиоксидантное действие α-токоферола сохраняется при высоких концентрациях кислорода, поэтому неудивительно, что

$ROO^{\cdot} + TocOH \longrightarrow ROOH + TocO^{\cdot}$

$ROO^{\cdot} + TocO^{\cdot} \longrightarrow ROOH +$ нерадикальный продукт

Рис. 15.30. Гасящее цепную реакцию антиоксидантное действие токоферолов (TocOH) по отношению к перекисным радикалам ($ROO^{\cdot}$).

Рис. 15.31. Продукт окисления α-токоферола. Нумерация атомов позволяет сопоставить их положение в продукте и исходном соединении.

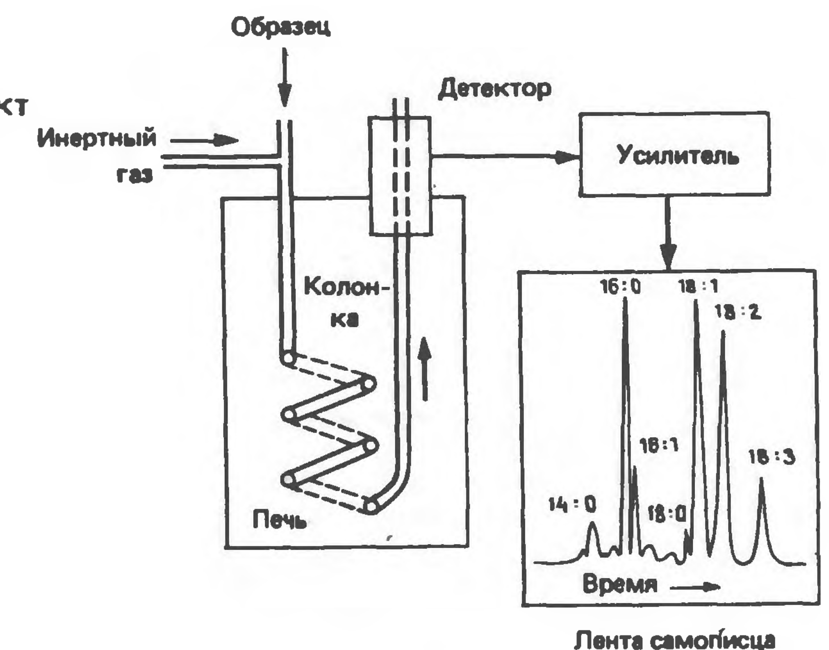


Рис. 15.32. Схема газожидкостного хроматографа и полученное с его помощью разделение длинноцепочечных жирных кислот (в виде метиловых эфиров); часть хроматограммы показана справа.

витамин Е накапливается в богатых липидами областях, контактирующих со средой, где поддерживается высокое парциальное давление кислорода,— в мембранах эритроцитов и клеток дыхательных путей.

Однако даже и в присутствии адекватного количества витамина Е происходит образование некоторого количества перекисей. Вторым эшелоном защиты мембран от разрушающего действия перекисей (см. с. 204) служит **глутатионпероксидаза**, в состав которой входит селен. Таким образом, действие витамина Е и селена состоит, по-видимому, в предохранении клеточных и субклеточных компонентов от повреждения перекисями, обеспечивая целостность органелл и препятствуя тем самым развитию патологических состояний при действии физических, химических или других стрессорных факторов.

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Старые методы разделения и идентификации липидов, основанные на классических операциях кристаллизации, перегонки и экстракции, в настоящее время в существенной степени дополнены хроматографическими методами. Особенно полезно применение **тонкослойной хроматографии** для разделения различных классов липидов и **газо-жидкостной хроматографии** (рис. 15.32) для разделения индивидуальных жирных кислот. Предварительной стадией при использовании этих методов является экстракция липидов системой растворителей — чаще всего смесью хлороформа и метанола (2:1).

Газо-жидкостная хроматография приводит к физическому разделению пропускаемой газовой фазы путем адсорбции ее компонентов на стационарной фазе, состоящей из инертного твердого носителя, например силикагеля, или инертных гранул размолотого жаропрочного кирпича, покрытых нелетучей жидкостью (например, смазочным жиром или силиконовым маслом). На практике применяют металлические или стеклянные колонки, заполненные указанным выше сорбентом; смесь метиловых эфиров жирных кислот в газообразном состоянии пропускают через колонку, по всей длине которой поддерживается температура 170—225° С (рис. 15.32). Постоян-



Рис. 15.33. Разделение основных классов липидов с помощью тонкослойной хроматографии. В качестве системы растворителей пригодна система гексан-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (в отношении 80:20:2 по объему).

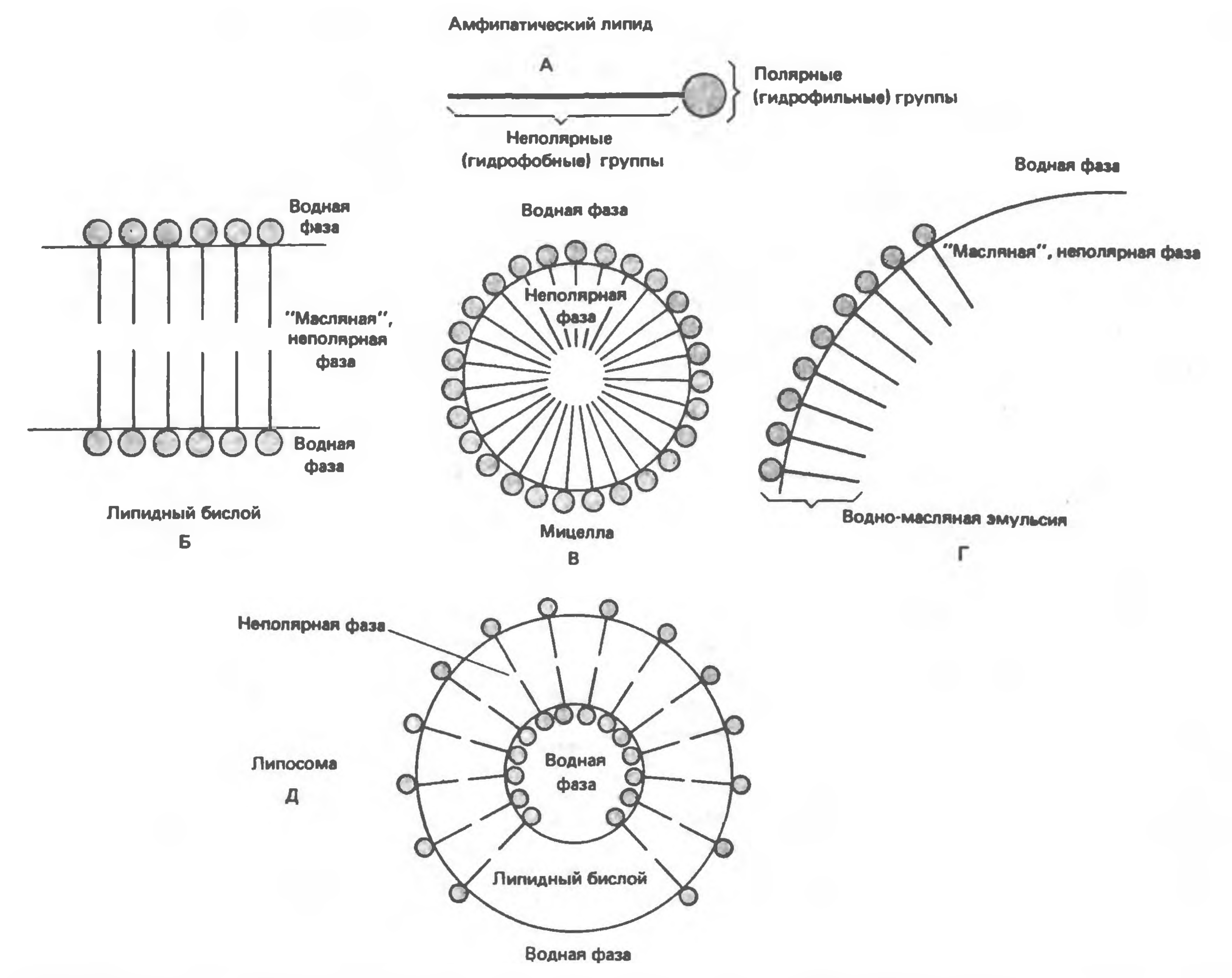


Рис. 15.34. Образование липидных мембран, мицелл, эмульсий и липосом из амфипатических липидов, например фосфолипидов.

ный поток инертного газа — аргона или гелия — увлекает за собой газообразные эфиры. В соответствии с общими принципами хроматографии разделение эфиров жирных кислот основано на различном сродстве компонентов газовой смеси к материалу стационарной фазы. Газы, имеющие большее сродство к стационарной фазе, движутся вдоль колонки медленнее и появляются на выходе из колонки позднее, чем те, которые имеют относительно меньшее сродство. По мере выхода из колонки индивидуальных эфиров жирных кислот они автоматически регистрируются физическими или химическими методами в виде серии пиков, распределенных во времени в соответствии с эффективностью их удерживания стационарной фазой (рис. 15.32). Площадь под пиком пропорциональна концентрации каждого из компонентов смеси. Идентификация каждого компонента производится путем сравнения с хроматограммой стандартной газовой смеси известного состава.

Преимущества газо-жидкостной хроматографии состоят в высокой чувствительности, позволяющей разделять очень малые количества смеси, и возможности многократного использования колонки. С помощью этого метода в составе природных жиров обнаружено большое число ранее не идентифицированных жирных кислот.

Тонкослойная хроматография осуществляется на стеклянных пластинках, покрытых тонким слоем суспензии адсорбента, чаще всего силикагелем. После высыхания суспензии пластинки прокаливают в печи заданное время при определенной температуре. Далее на охлажденную «активированную» пластинку наносят смесь липидов в подходящем растворителе. После испарения растворителя край пластинки, ближайший к нанесенному пятну, погружают в смесь соответствующих растворителей, далее пластинку «проявляют» в замкнутой камере, пока растворитель не достигнет противоположного края пластинки. Затем пластинку высушивают для удале-

ния растворителя и определяют положение пятен либо путем их «обугливания» (обработка серной кислотой с последующим нагреванием), либо по флуоресценции (после обработки дихлорфлуоресцеином), либо путем обработки парами иода (рис. 15.33).

АМФИПАТИЧЕСКИЕ ЛИПИДЫ

Мембраны, мицеллы, липосомы и эмульсии

В общем липиды нерастворимы в воде, поскольку содержат преимущественно неполярные (углеводородные) группы. Однако жирные кислоты, фосфолипиды, сфинголипиды, желчные соли и, в меньшей степени, холестерол содержат и полярные группы. Следовательно, одна часть молекулы **гидрофобна** (нерастворима в воде) а другая — **гидрофильна** (растворима в воде). Такие молекулы называют **амфипатическими** (рис. 15.34). На поверхности раздела масло — вода они располагаются таким образом, чтобы **полярные группы находились в водной фазе**, а **неполярные группы — в масляной**. Бислой, образованный такими полярными липидами, считают основой структуры биологических мембран (см. гл. 42). По достижении некоторой критической концентрации полярные липиды образуют в водной среде **мицеллы**. Агрегация желчных солей в мицеллы и образование смешанных мицелл, содержащих продукты гидролиза жиров, облегчают всасывание липидов из кишечника. Обработка находящегося в водной среде амфипатического липида ультразвуком приводит к образованию **липосом**. Липосома представляет собой сферически замкнутый липидный бислой, внутри которого оказывается часть водной среды. Липосомы могут найти применение в клинике, особенно при использовании их в комбинации с тканеспецифичными антителами; они могут служить переносчиками лекарств по системе циркуляции к определенным органам. **Эмульсии**, представляющие собой взвесь в водной среде крупных частиц неполярных липидов, стабилизируются эмульгирующими агентами, такими, как полярные липиды (например, лецитин), которые образуют поверхностный слой, отделяющий неполярный материал от водной фазы (рис. 15.34).

ЛИТЕРАТУРА

Christie W. W. Lipid Analysis, Pergamon Press, 1973.

Frankel E. N. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids, Prog. Lipid. Res., 1985, **23**, 197.

Gunstone F. D., Harwood J. L., Padley F. B. The Lipid Handbook, Chapman and Hall, 1986.

Gurr A. I., James A. T. Lipid Biochemistry: An Introduction. 3rd ed., Wiley, 1980.

Hawthorne J. N., Ansell G. B. (eds) Phospholipids, Elsevier, 1982.

Johnson A. R., Davenport J. B. Biochemistry and Methodology of Lipids, Wiley, 1971.

Sevanian A., Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems, Annu. Rev. Nutr., 1985, **5**, 365.

Vance D. E., Vance J. E. (eds) Biochemistry of Lipids and Membranes, Benjamin/Cummings, 1985.

Глава 16

Промежуточный обмен

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Процессы промежуточного обмена включают превращения компонентов пищи после их переваривания и всасывания. Промежуточный обмен не только описывает метаболические пути превращения индивидуальных молекул, он показывает также взаимосвязи между различными метаболическими путями; исследование промежуточного обмена предполагает выяснение механизмов регуляции потоков метаболитов по различным путям. Метаболические пути разделяют на три категории (рис. 16.1).

1. **Анаболические пути** включают процессы синтеза компонентов различных структур организма и соединений, обеспечивающих его функционирование. Один из таких путей — синтез белков. Свободная энергия, необходимая для этих процессов, поступает в результате функционирования метаболических путей, образующих следующую категорию.

2. **Катаболические пути** включают окислительные процессы, поставляющие свободную энергию и запасающие ее в форме высокоэнергетических фосфатов или восстановительных эквивалентов; таковы дыхательная цепь и окислительное фосфорилирование.

3. **Амфиболические пути** выполняют сразу несколько функций, они находятся на «перекрестках» метаболизма и связывают анаболические и катаболические пути; примером может служить цикл лимонной кислоты.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Знание обмена веществ нормального организма необходимо для понимания причин многих болезней. Для нормального метаболизма характерны адаптационные изменения в период голодания, при физической нагрузке, в состояниях беременности и лактации. Нарушения метаболизма возникают, например, при недостаточности питания, дефиците тех или иных ферментов или при дисбалансе гормонов.

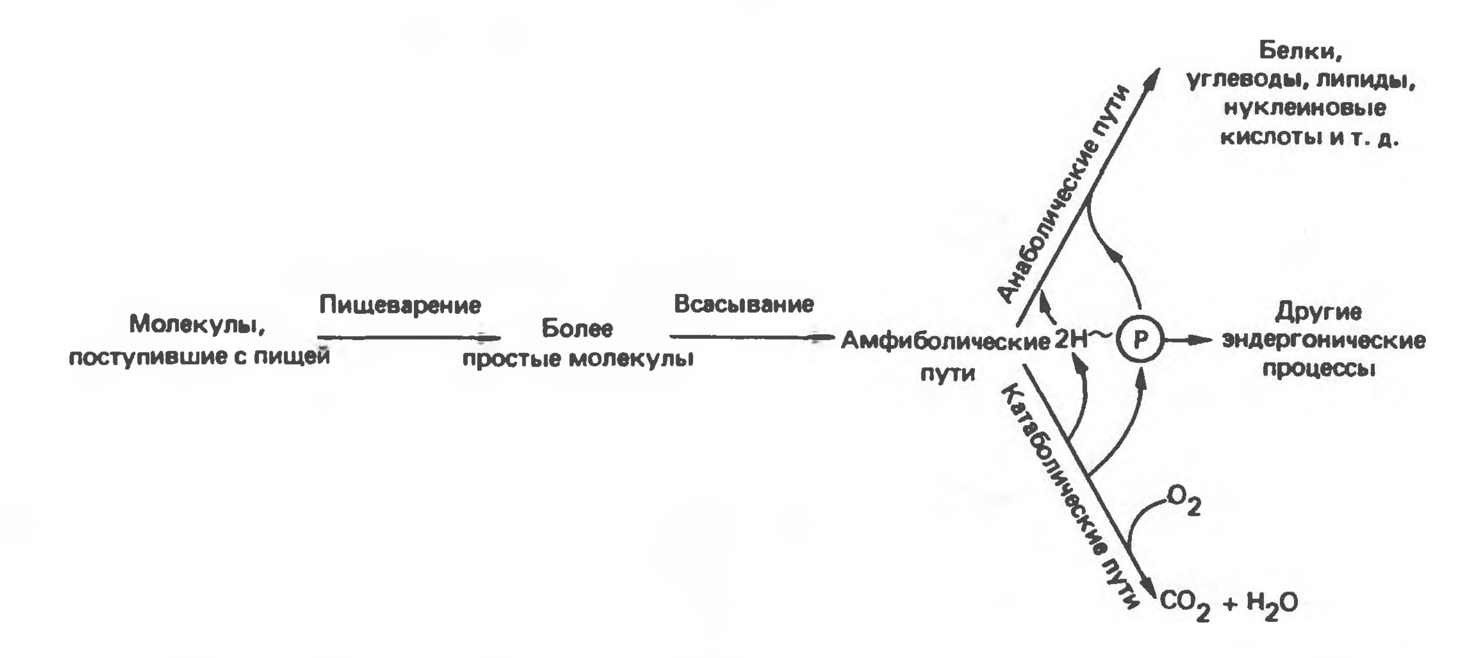


Рис. 16.1. Три основные категории метаболических путей. Катаболические пути трансформируют свободную энергию в форму восстановительных эквивалентов (2Н) или высокоэнергетических фосфатов (~Р); эта энергия идет на обеспечение реакций анаболических путей. Амфиболические пути служат связующим звеном между катаболическими и анаболическими путями.

Важным примером болезни, обусловленной нарушением метаболизма («метаболическая болезнь»), является сахарный диабет.

ОСНОВНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ

Характер метаболизма в тканях во многом определяется питанием. У человека и ряда других млекопитающих метаболическим превращениям подвергаются продукты, абсорбируемые после переваривания содержащихся в пище углеводов, липидов и белков. Это главным образом глюкоза, триацилглицерол и аминокислоты. У жвачных животных (и в меньшей степени у других травоядных) целлюлоза переваривается симбиотическими микроорганизмами с образованием низших гомологов органических кислот (уксусной, пропионовой, масляной); тканевый метаболизм у этих животных адаптирован к утилизации в качестве основного субстрата низших жирных кислот.

Метаболизм углеводов (рис. 16.2)

У всех млекопитающих глюкоза в клетках превращается в пируват и лактат по метаболическому пути, который называется **гликолизом**. Для вступления на этот путь необходимо предварительное фосфорилирование. Гликолиз может протекать в отсутствие кислорода (анаэробно), если конечным продуктом является лактат. Ткани, которые потребляют кислород (аэробные условия), способны осуществлять превращение пирувата в ацетил-СоА, который далее может вступать в **цикл лимонной кислоты**; в этом цикле ацетил-СоА полностью окисляется до CO_2 и H_2O; бо́льшая часть потенциальной свободной энергии процесса запасается в форме АТР в результате **окислительного фосфорилирования** (рис. 17.2). Таким образом, глюкоза служит главным видом топлива для многих тканей, однако она (а также ее метаболиты) участвует и в других процессах. 1. Глюкоза превращается в полимер **гликоген**, который

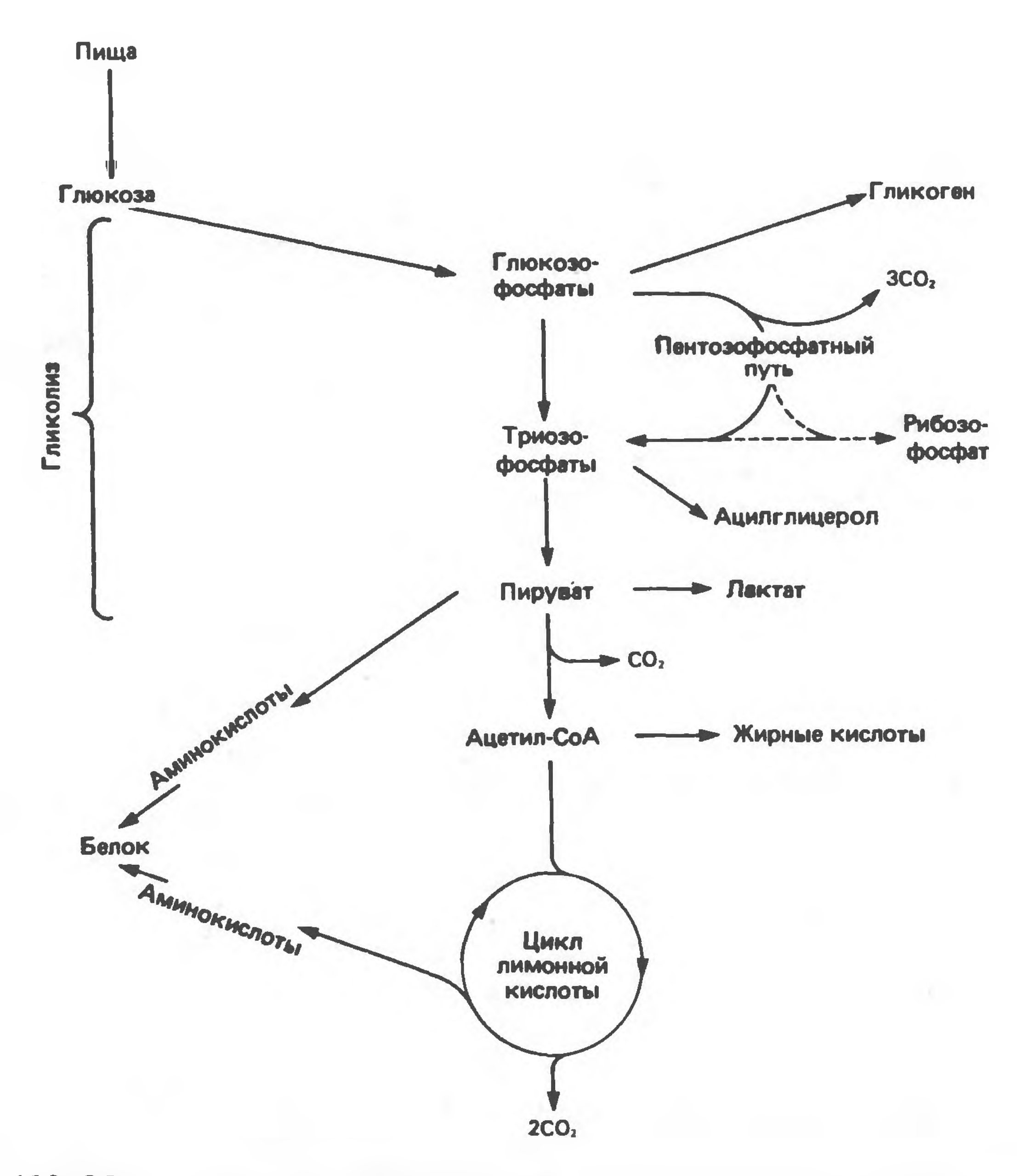


Рис. 16.2. Общая схема метаболизма углеводов с указанием главных конечных продуктов.

запасается в ряде тканей, в особенности в скелетных мышцах и в печени. 2. Субстрат **пентозофосфатного пути** является одним из промежуточных продуктов гликолиза. Этот путь служит источником восстановительных эквивалентов (2Н), используемых в процессах биосинтеза, например в биосинтезе жирных кислот; кроме того, он является источником рибозы, необходимой для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. 3. **Триозофосфат**, образующийся на одной из стадий гликолиза, является источником **глицерола**, используемого в синтезе ацилглицеролов (жиров). 4. Пируват и ряд промежуточных соединений цикла лимонной кислоты — это источники углеродных скелетов, используемых в синтезе **аминокислот**, а ацетил-СоА служит основным строительным блоком в синтезе длинноцепочечных **жирных кислот** и **холестерола** — предшественника всех синтезируемых в организме стероидов.

Метаболизм липидов (рис. 16.3)

Источником длинноцепочечных жирных кислот служат синтез de novo из ацетил-СоА (в свою очередь образующегося из углеводов) и пищевые липиды. В тканях жирные кислоты могут либо окисляться до ацетил-СоА (**β-окисление**), либо эстерифицироваться в ацилглицеролы (триацилглицерол является главным энергетическим резервом организма). Ацетил-СоА, образующийся при β-окислении, участвует в ряде важных процессов.

1. Ацетил-СоА может **полностью окисляться** до $CO_2 + H_2O$ в цикле лимонной кислоты. Жирные кислоты являются источником значительных количеств энергии (тканевым топливом) при утилизации в процессе β-окисления, а затем в ходе реакций цикла лимонной кислоты.

2. Ацетил-СоА служит источником атомов углерода для **холестерола**.

3. В печени из него образуется ацетоацетат — исходное **кетоновое тело**. Кетоновые тела являются альтернативным водорастворимым тканевым топливом, которое при определенных условиях может стать важным источником энергии (например, при голодании).

Метаболизм аминокислот (рис. 16.4)

Аминокислоты необходимы для синтеза белков. Некоторые из них должны обязательно поступать с пищей (**незаменимые аминокислоты**), поскольку ткани не способны их синтезировать. Остальные **аминокислоты** (заменимые) также поступают с пищей, но могут образовываться и из промежуточных метаболитов путем **переаминирования**, т. е. переноса аминогрупп от других аминокислот, присутствующих в избыточном количестве. После **дезаминирования** избыточный аминный азот удаляется в составе **мочевины**; остающийся после переаминирования углеродный скелет либо окисляется до CO_2 в цикле лимонной кислоты, либо превращается в глюкозу (глюконеогенез) или кетоновые тела.

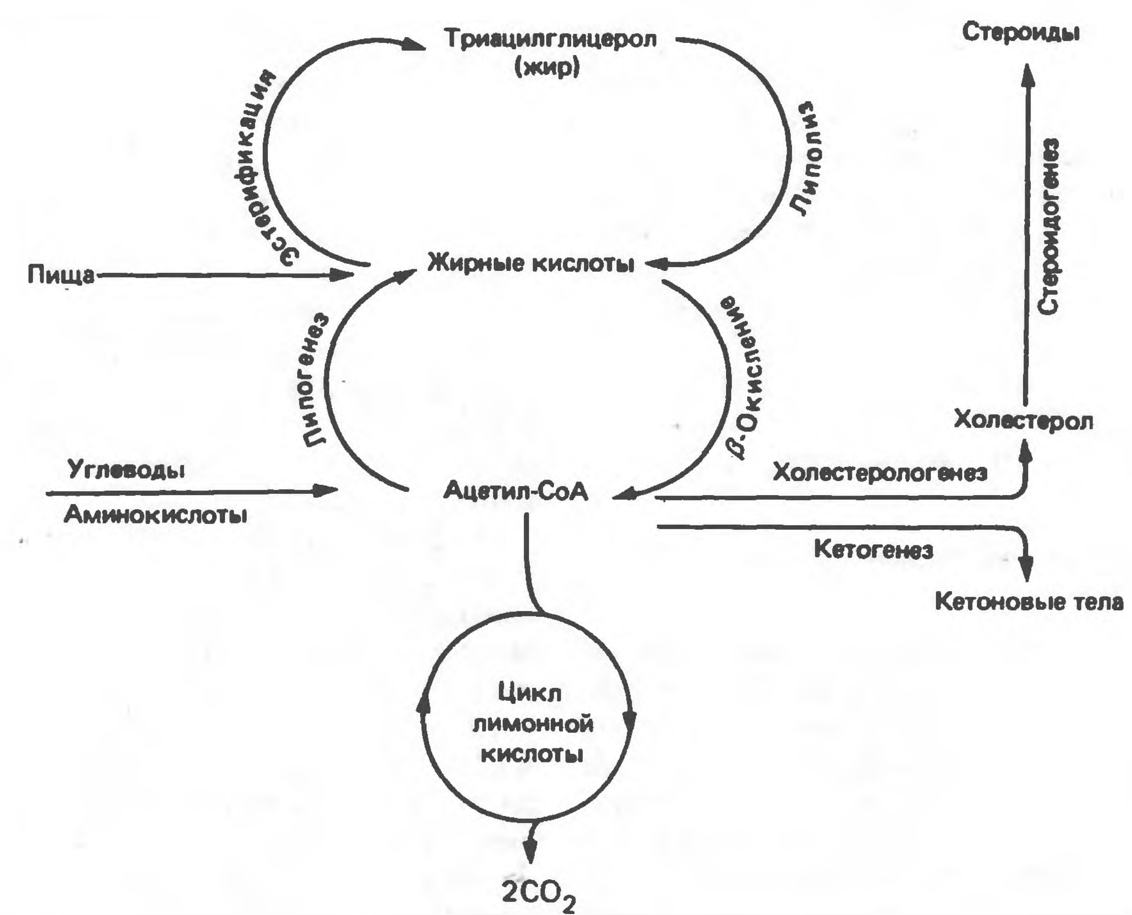


Рис. 16.3. Общая схема метаболизма липидов с указанием главных конечных продуктов. Кетоновые тела включают ацетоацетат, 3-гидроксибутират и ацетон.

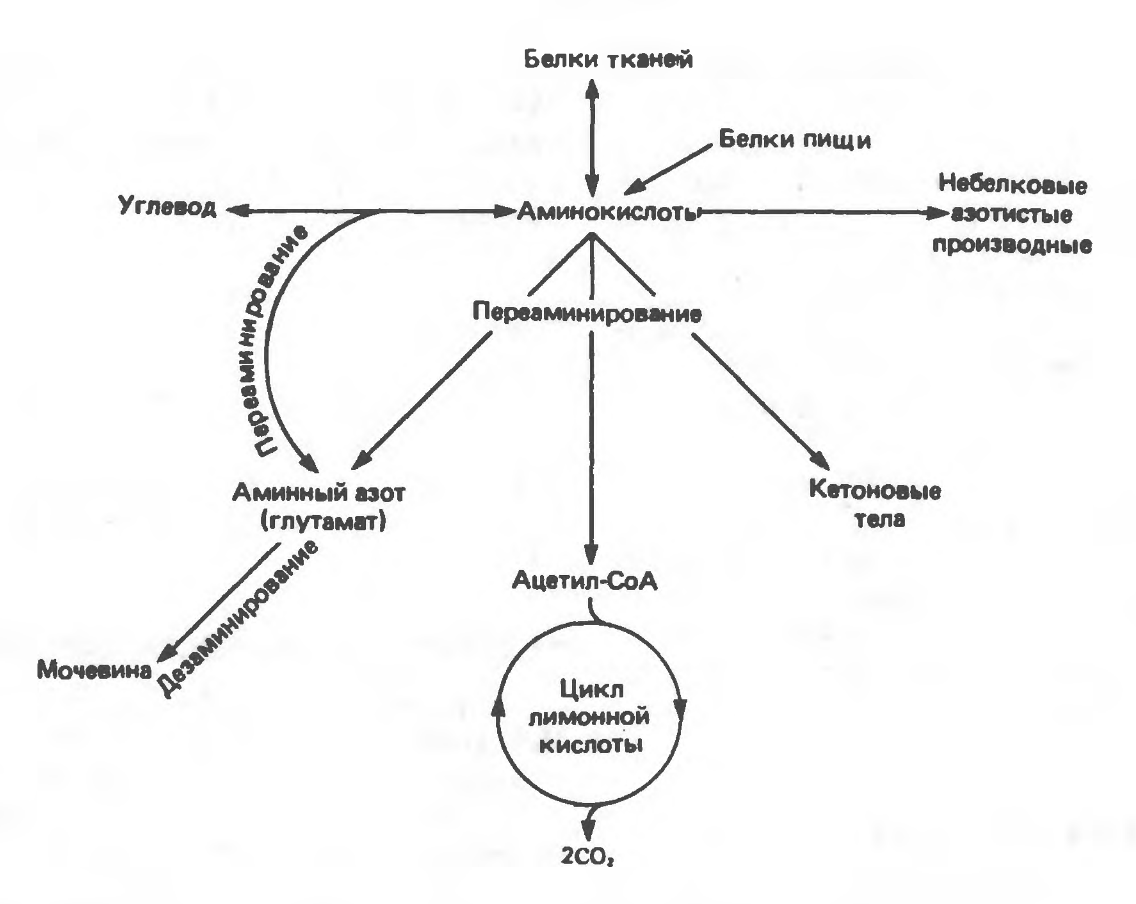


Рис. 16.4. Общая схема метаболизма аминокислот с указанием главных конечных продуктов.

Помимо использования в синтезе белков аминокислоты служат предшественниками ряда важных соединений — пуринов, пиримидинов, гормонов (например, адреналина и тироксина).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

Как показано на рис. 2.3, метаболические пути можно исследовать на разных уровнях организации, которые удобно разделить на две главные группы: 1) **на уровне органов и тканей** — в этом случае можно следить за поступающими в ткань субстратами и уходящими из нее метаболитами и описать ход их превращений; 2) **на субклеточном уровне** — каждая клеточная органелла (например, митохондрия), каждый компартмент (например, цитозоль) выполняют специфическую биохимическую роль в рамках общей системы внутриклеточного метаболизма.

Промежуточный метаболизм на уровне тканей и органов

Аминокислоты, образовавшиеся после переваривания белков, и глюкоза, образовавшаяся в результате переваривания углеводов, после всасывания поступают в **печеночную воротную вену.** Следовательно, эти метаболиты вместе с другими водорастворимыми продуктами пищеварения сначала поступают в печень (рис. 16.5). **Печень** выполняет важную метаболическую функцию — регулирует концентрации большинства содержащихся в крови метаболитов, в первую очередь глюкозы и аминокислот. Например, глюкоза при избыточном поступлении либо превращается в гликоген (**гликогенез**), либо используется для синтеза жиров (**липогенез**). В промежутках между приемами пищи печень поддерживает концентрацию глюкозы в крови на физиологическом уровне за счет запасов гликогена (**гликогенолиз**) или же (вместе с почками) путем превращения в глюкозу неуглеводных метаболитов, таких, как лактат, глицерол и аминокислоты (**глюконеогенез**). Поддержание в крови адекватной концентрации глюкозы жизненно важно для ряда тканей, использующих в качестве топлива исключительно этот моносахарид (мозг, эритроциты). В печени осуществляются также **синтез главных белков плазмы** (например, альбумина) и **дезаминирование аминокислот**, присутствующих в избыточном количестве; образующаяся при этом мочевина переносится током крови в почки и экскретируется.

Скелетная мышца использует в качестве топлива глюкозу, превращая ее в лактат и CO_2. Запасаемый мышцей гликоген используется как топливо в процессе мышечного сокращения. В мышце осуществляется синтез мышечных белков из аминокислот плазмы. На долю мышечной ткани приходится около 50% всей массы организма; таким образом, она содержит значительный запас белка, который может быть использован для пополнения аминокислот плазмы крови, особенно в те периоды, когда их недостаточно в пищевом рационе.

Липиды (рис. 16.6) при переваривании образуют

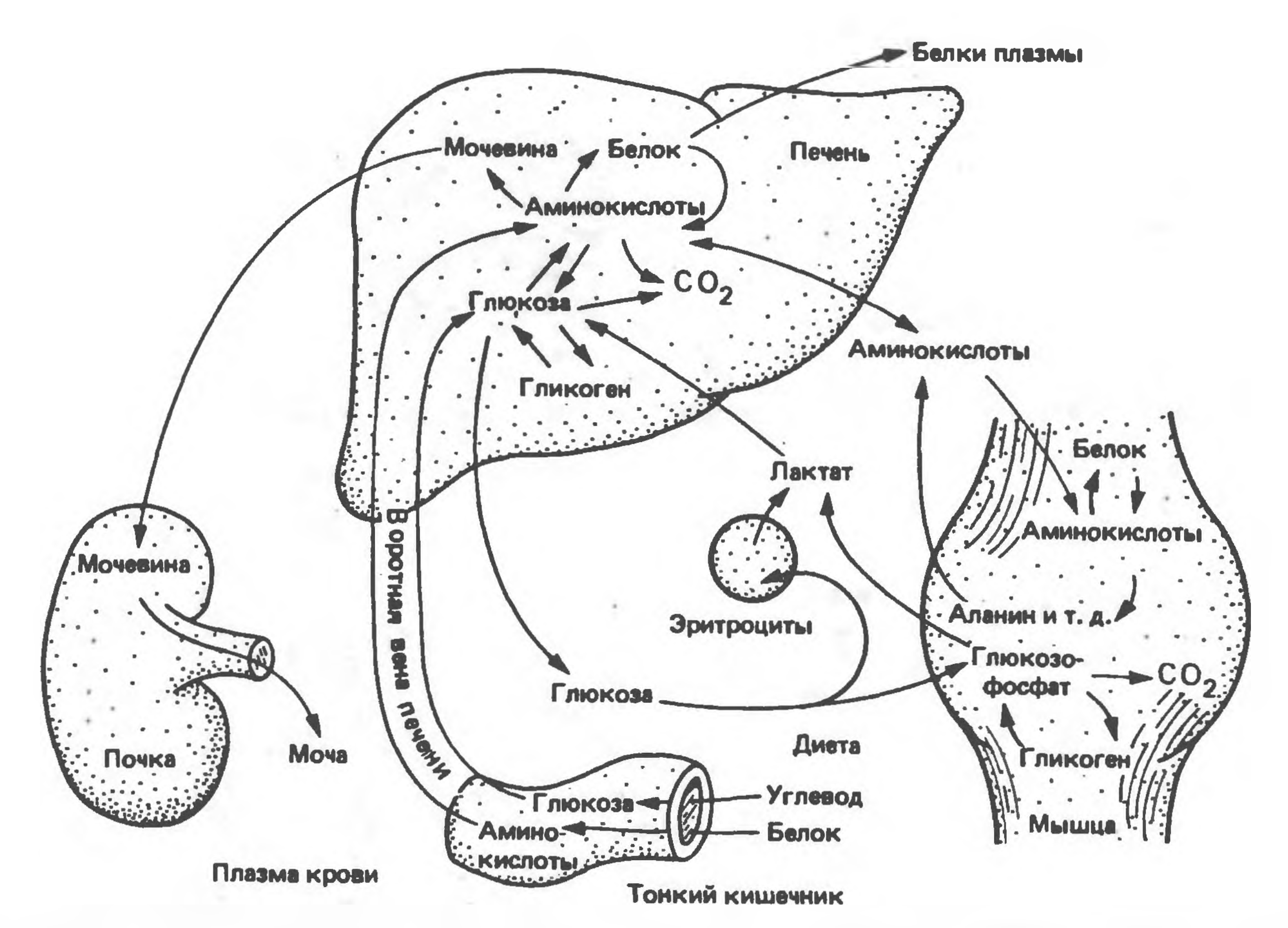


Рис. 16.5. Транспорт и дальнейшая судьба главных углеводов и аминокислот и их метаболитов. Следует учитывать, что содержание в мышце свободной глюкозы невелико, поскольку, попадая в мышцу, она быстро фосфорилируется.

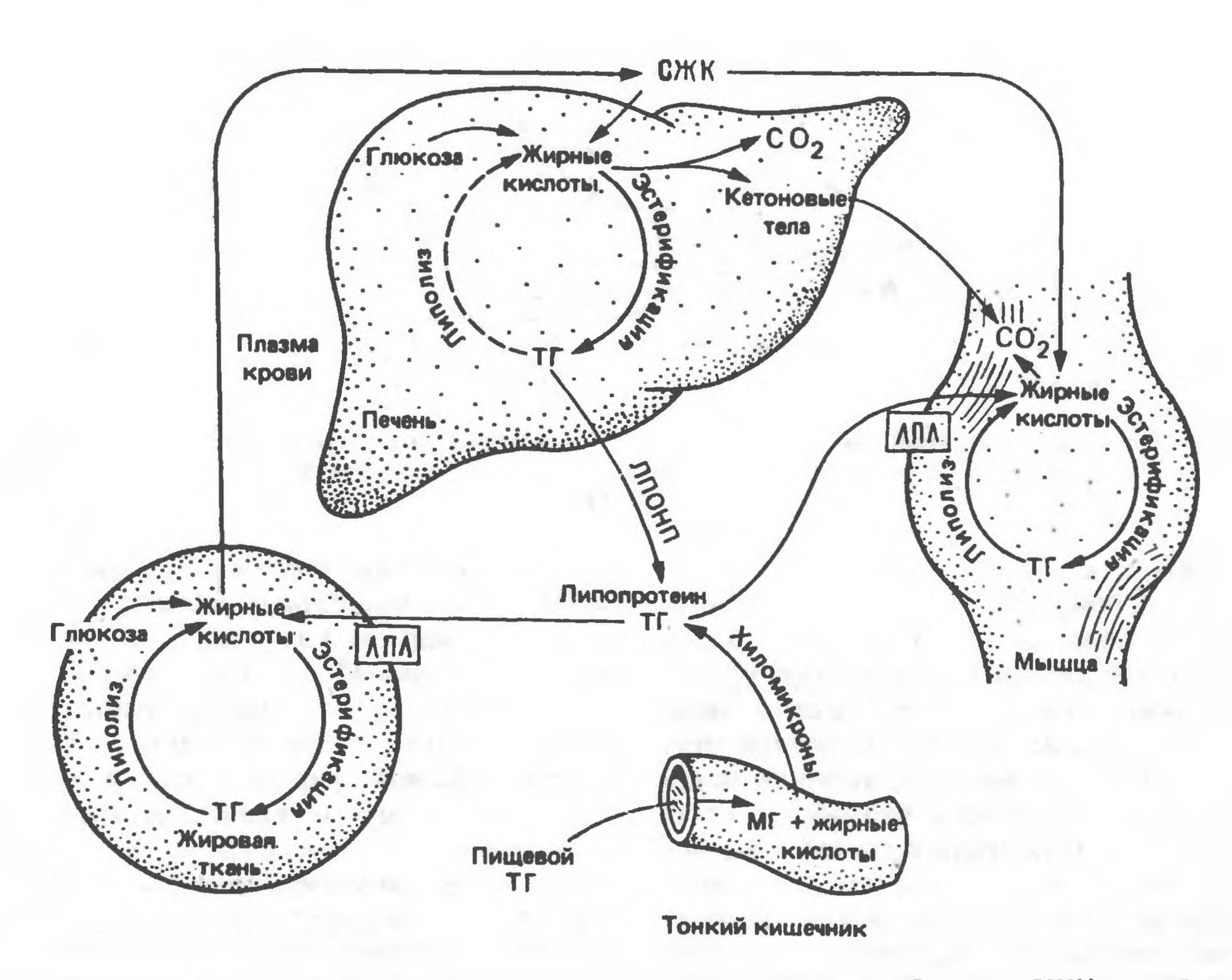


Рис. 16.6. Транспорт и дальнейшая судьба главных липидных субстратов и их метаболитов. СЖК — свободная жирная кислота; ЛПЛ — липопротеинлипаза; МГ — моноацилглицерол; ТГ — триацилглицерол; ЛПОНП — липопротеин очень низкой плотности.

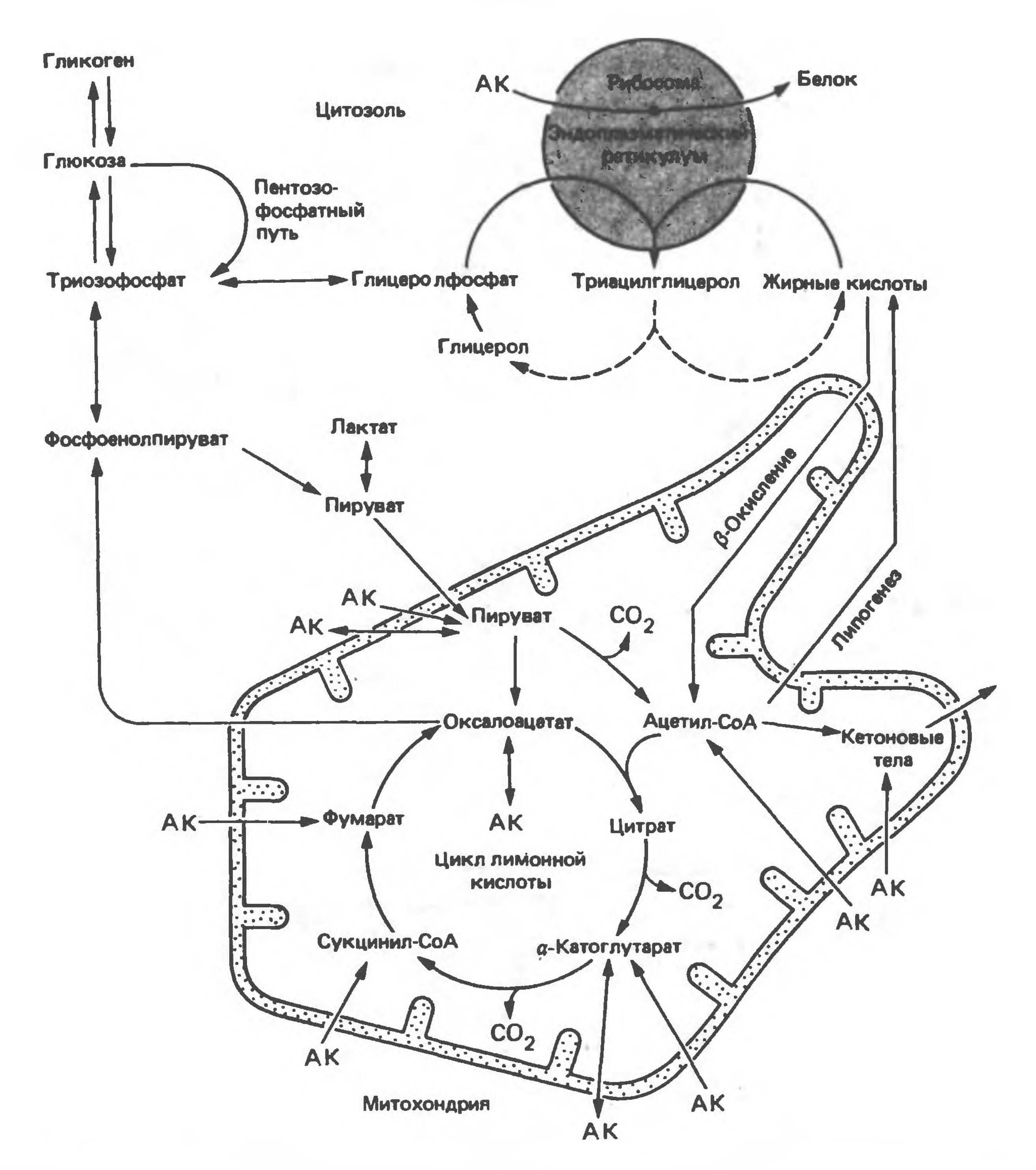


Рис. 16.7. Внутриклеточная локализация и интеграция главных метаболических путей в паренхиматозной клетке печени. АК → метаболизм одной или нескольких незаменимых аминокислот; АК ↔ метаболизм одной или нескольких заменимых аминокислот.

моноацилглицеролы и жирные кислоты. В клетках кишечника они ассоциируются с белками и секретируются сначала в лимфатическую систему, а затем в систему кровообращения, в которой циркулируют в виде **липопротеина**, известного под названием **хиломикрон**. Все гидрофобные липидрастворимые продукты пищеварения (в частности, холестерол) включаются в состав липопротеинов, что облегчает их транспортировку от одной ткани к другой в водной среде — плазме. В отличие от глюкозы и аминокислот триацилглицеролы в составе хиломикрона не захватываются печенью, они гидролизуются во внепеченочных тканях ферментом **липопротеинлипазой**; освобождающиеся жирные кислоты либо включаются в состав тканевых липидов, либо окисляются и используются как топливо. Другим важным источником длинноцепочечных жирных кислот является их синтез (**липогенез**) из углеводов, идущий главным образом в жировой ткани и в печени.

Триацилглицерол жировой ткани служит главным топливным резервом организма. После его гидролиза (**липолиза**) жирные кислоты освобождаются и поступают в систему кровообращения. Свободные жирные кислоты далее поглощаются большинством тканей (за исключением мозга и эритроцитов), где они либо этерифицируются, образуя ацилглицеролы, либо окисляются до CO_2, выполняя роль топлива. В печени имеются еще два важных метаболических пути: 1. Избыток триацилглицеролов, образующихся либо из жирных кислот, либо путем липогене-

за, секретируется в систему кровообращения в виде **липопротеинов очень низкой плотности** (ЛПОНП). Далее эти триацилглицеролы разделяют судьбу хиломикронов. 2. Частичное окисление жирных кислот ведет к образованию кетоновых тел (**кетогенез**). Кетоновые тела транспортируются из печени во внепеченочные ткани, где они служат еще одним важным топливным ресурсом.

Промежуточный метаболизм на субклеточном уровне

Основные биохимические функции субклеточных компонентов и клеточных органелл приведены в табл. 2.4. Однако большинство клеток выполняют специализированные функции, в связи с чем важное значение приобретают определенные метаболические пути, тогда как другие практически не используются. На рис. 16.7 представлены основные метаболические пути и их взаимосвязь в паренхиматозных клетках печени с указанием их внутриклеточной локализации.

Сразу становится очевидной центральная роль **митохондрий**, в которых пересекаются процессы метаболизма углеводов, липидов и аминокислот. В митохондриях, в частности, локализованы ферменты цикла лимонной кислоты, дыхательной цепи и синтеза АТР, β-окисления жирных кислот и образования кетоновых тел. Здесь же находится «сборный пункт» кетокислот (после дезаминирования аминокислот), которые используются далее для синтеза заменимых аминокислот.

Гликолиз, пентозофосфатный путь и синтез жирных кислот осуществляется в **цитозоле**. Следует отметить, что при глюконеогенезе даже такие вещества, как лактат и пируват, которые образуются в цитозоле, должны поступать внутрь митохондрии и превращаться в оксалоацетат; из последнего образуется глюкоза.

Мембраны **эндоплазматического ретикулума** содержат ферментную систему синтеза ацилглицеролов, а рибосомы ответственны за синтез белков.

Следует отметить, что транспорт метаболитов, различающихся по размерам, заряду и растворимости в липидах мембран, окружающих органеллы, связан с работой весьма сложных механизмов. Некоторые из них обсуждались, когда речь шла о митохондриальной мембране (см. гл. 13); другие механизмы будут рассмотрены в последующих главах.

Глава 17

Цикл лимонной кислоты: катаболизм ацетил-СоА

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса, цикл трикарбоновых кислот) представляет собой серию реакций, протекающих в митохондриях, в ходе которых осуществляются катаболизм ацетильных групп и высвобождение водородных эквивалентов; при окислении последних поставляется свободная энергия топливных ресурсов тканей. Ацетильные группы находятся в составе **ацетил-СоА** (CH_3- $-CO\sim S-CoA$, активного ацетата), тиоэфира кофермента А. В состав СоА входит витамин — пантотеновая кислота.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Главная функция цикла лимонной кислоты состоит в том, что он является общим конечным путем окисления углеводов, липидов и белков, поскольку в ходе метаболизма глюкоза, жирные кислоты и аминокислоты превращаются либо в ацетил-СоА, либо в промежуточные соединения рассматриваемого цикла. Цикл лимонной кислоты играет также главную роль в процессах глюконеогенеза, переаминирования, дезаминирования и липогенеза. Хотя ряд этих процессов протекает во многих тканях, печень — единственный орган, в котором идут все перечисленные процессы. Поэтому серьезные последствия вызывает повреждение большого числа клеток печени или замещение их соединительной тканью, как это имеет место при остром гепатите или циррозе соответственно. О жизненно важной роли цикла лимонной кислоты свидетельствует и тот факт, что у человека почти неизвестны (или их вообще нет) генетически обусловленные изменения ферментов, катализирующих реакции цикла; вероятно, наличие таких нарушений несовместимо с нормальным развитием.

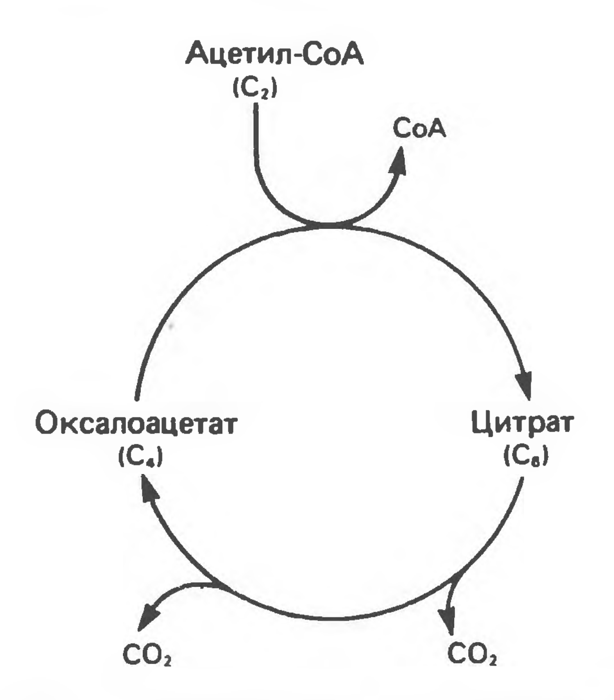


Рис. 17.1. Цикл лимонной кислоты; рисунок иллюстрирует каталитический роль оксалоацетата.

КАТАБОЛИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Цикл начинается с взаимодействия молекулы ацетил-СоА с четырехуглеродной дикарбоновой кислотой — щавелевоуксусной (оксалоацетатом), в результате образуется **шестиуглеродная трикарбоновая кислота**, называемая **лимонной**. Далее следует серия реакций, в ходе которых происходит высвобождение двух молекул CO_2 и регенерация оксалоацетата (рис. 17.1). Поскольку количество оксалоацетата, необходимое для превращения большого числа ацетильных единиц в CO_2, весьма невелико, можно считать, что оксалоацетат выполняет **каталитическую роль.**

Цикл лимонной кислоты является механизмом, обеспечивающим улавливание большей части свободной энергии, освобождаемой в процессе окисления углеводов, липидов и белков. В процессе окисления ацетил-СоА благодаря активности ряда специфических дегидрогеназ происходит образование восстановительных эквивалентов в форме водорода или электронов. Последние поступают в дыхательную цепь; при функционировании этой цепи происходит окислительное фосфорилирование, т. е. синтезируется АТР (рис. 17.2; см. также гл. 13).

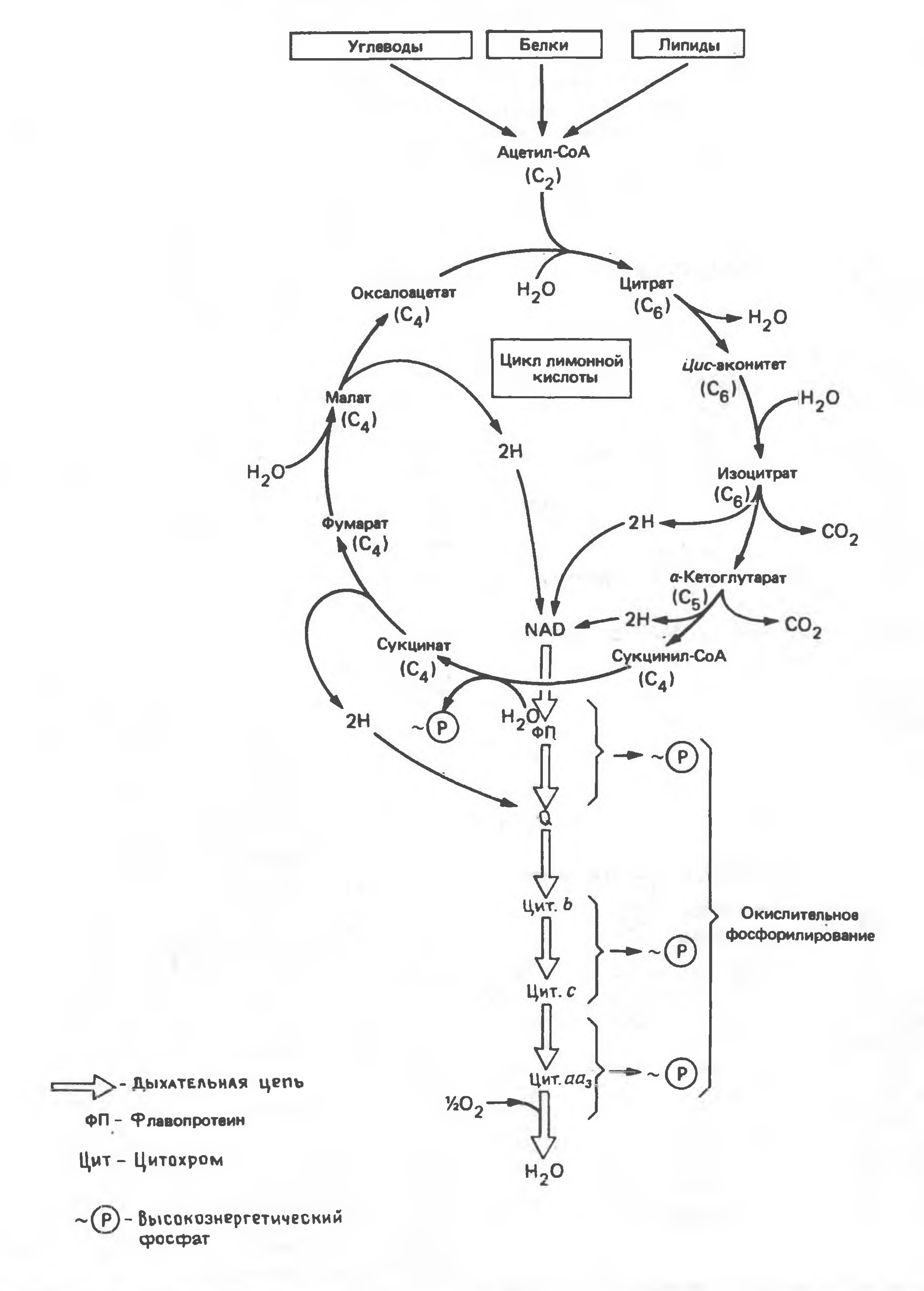


Рис. 17.2. Цикл лимонной кислоты — главный катаболический путь ацетил-CoA у аэробных организмов. Ацетил-CoA — продукт катаболизма углеводов, белков и липидов вступает в цикл вместе с H_2O и окисляется до CO_2, поставляя восстановительные эквиваленты (2H). Последующее окисление 2H в дыхательной цепи происходит в условиях сопряжения с фосфорилированием ADP. За один оборот цикла 11 связей ~Ⓟ образуется путем окислительного фосфорилирования и одна связь ~Ⓟ образуется на субстратном уровне при превращении сукцинил-CoA в сукцинат. ⇨ — дыхательная цепь, ФП — флавопротеин, Цит — цитохром, ~Ⓟ — высокоэнергетический фосфат.

Ферменты цикла лимонной кислоты локализованы в **митохондриальном матриксе**, где они находятся либо в свободном состоянии, либо на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны; в последнем случае облегчается **перенос восстановительных эквивалентов на ферменты дыхательной цепи**, локализованные во внутренней митохондриальной мембране.

РЕАКЦИИ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ (рис. 17.3)[1]

Начальная реакция — конденсация ацетил-CoA и оксалоацетата, приводящая к образованию цитрата, катализируется конденсирующим ферментом, **цитратсинтазой**, при этом происходит образование связи углерод-углерод между метильным углеродом ацетил-CoA и карбонильным углеродом оксалоацетата. За реакцией конденсации, приводящей к образованию цитрил-CoA, следует гидролиз тиоэфирной связи, сопровождающийся потерей большого количества свободной энергии в форме теплоты; это определяет протекание реакции слева направо до ее завершения:

$$\text{Ацетил-CoA} + \text{Оксалоацетат} + H_2O \rightarrow \text{Цитрат} + \text{CoA}\cdot\text{SH}$$

Превращение цитрата в изоцитрат катализируется **аконитазой** (аконитатгидратазой), содержащей железо в Fe^{2+}-состоянии. Эта реакция осуществляется в две стадии: сначала происходит дегидратация с образованием *цис*-аконитата (часть его остается в комплексе с ферментом), а затем — гидратация и образование изоцитрата:

Цитрат ⟷ *цис*-Аконитат (в комплексе с ферментом) ⟷ Изоцитрат
(H_2O на каждой стадии)

Реакция ингибируется **фторацетатом**, который сначала превращается во фторацетил-CoA; последний конденсируется с оксалоацетатом, образуя фторцитрат. Непосредственным ингибитором аконитазы является фторцитрат; при ингибировании накапливается цитрат.

Эксперименты с использованием промежуточных соединений, меченных изотопом ^{14}C, показывают, что аконитаза взаимодействует с цитратом асимметрично: она всегда действует на ту часть молекулы цитрата, которая образовалась из оксалоацетата. Это сначала было трудно объяснить, так как лимонная кислота является внешне симметричным соединением. Однако положение в пространстве двух групп $-CH_2COOH$ лимонной кислоты относительно групп $-OH$ и $-COOH$ неидентично. Об асимметричном действии аконитазы свидетельствует «судьба» меченого ацетил-CoA (т.е. положение атомов ^{14}C) в интермедиатах цикла лимонной кислоты (рис. 17.3). Возможно, что *цис*-аконитат не является обязательным интермедиатом между цитратом и изоцитратом и образуется на боковой ветви основного пути.

Далее **изоцитратдегидрогеназа** катализирует дегидрогенирование с образованием оксалосукцината. Описаны три различных формы изоцитратдегидрогеназы. Одна из них, NAD^+-зависимая, найдена только в митохондриях. Две другие формы фермента являются $NADP^+$-зависимыми, причем одна из них также находится в митохондриях, а другая в цитозоле. Окисление изоцитрата, связанное с работой дыхательной цепи, осуществляется почти исключительно NAD^+-зависимым ферментом:

$$\text{Изоцитрат} + NAD^+ \longleftrightarrow \text{Оксалосукцинат (в комплексе с ферментом)} \leftrightarrow \alpha\text{-Кетоглутарат} + CO_2 + NADH + H^+.$$

Далее следует декарбоксилирование с образованием α-кетоглутарата, которое также катализируется изоцитратдегидрогеназой. Важным компонентом реакции декарбоксилирования являются ионы Mn^{2+} (или Mg^{2+}). Судя по имеющимся данным, оксалосукцинат, образующийся на промежуточной стадии реакции, остается в комплексе с ферментом.

α-Кетоглутарат в свою очередь подвергается **окислительному декарбоксилированию**, сходному с окислительным декарбоксилированием пирувата (см. рис. 18.5): в обоих случаях субстратом является α-кетокислота. Реакция катализируется **α-кетоглутаратдегидрогеназным комплексом** и требует участия того же набора кофакторов — тиаминдифосфата, липоата, NAD^+, FAD и CoA; в результате образуется сукцинил-CoA — тиоэфир, содержащий высокоэнергетическую связь.

$$\alpha\text{-Кетоглутарат} + NAD^+ + \text{CoA}\cdot\text{SH} \rightarrow \text{Сукцинил-CoA} + CO_2 + NADH + H^+.$$

Равновесие реакции настолько сильно сдвинуто в сторону образования сукцинил-CoA, что ее можно считать физиологически однонаправленной. Как и при окислении пирувата (см. с. 186), реакция ингибируется арсенатом, что приводит к накоплению субстрата (**α-кетоглутарата**).

Продолжением цикла является превращение сукцинил-CoA в сукцинат, катализируемое **сукцинаттиокиназой (сукцинил-CoA-синтетазой)**:

$$\text{Сукцинил-CoA} + P_i + GDP \leftarrow\rightarrow \text{Сукцинат} + GTP + \text{CoA}\cdot\text{SH}$$

---

[1] Согласно рекомендациям, принятым Комитетом редакторов биохимических журналов (1975 г.), окончание ***ат*** (например, пальмитат) обозначает смесь свободной кислоты и ее ионизированной формы (при рассматриваемом pH) без указания природы присутствующих катионов. Это положение принято в тексте для всех карбоновых кислот.

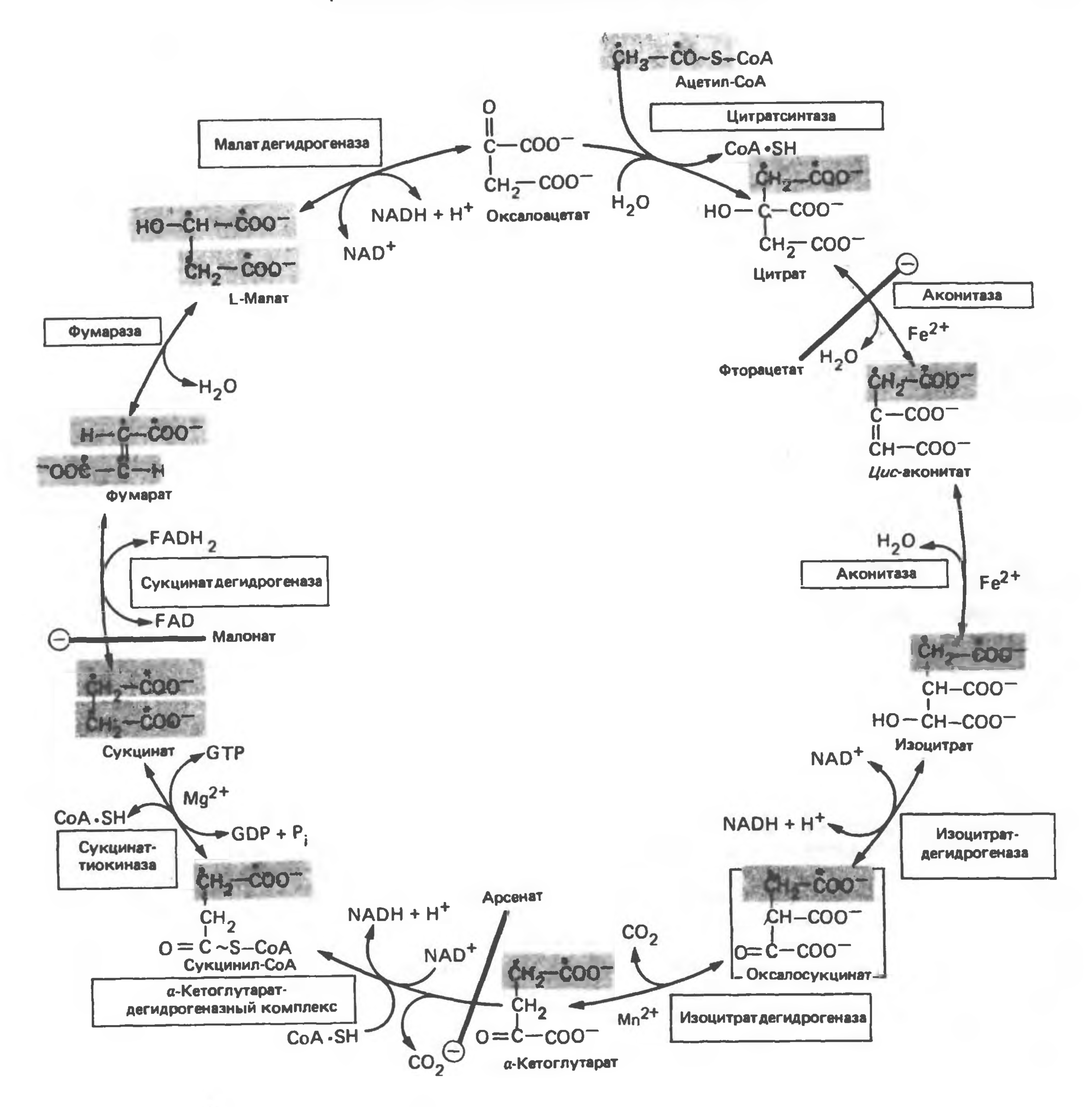


Рис. 17.3. Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса). Окисление NADH и $FADH_2$ в дыхательной цепи сопровождается генерированием ATP путем окислительного фосфорилирования. Чтобы проследить судьбу ацетил-CoA в ходе цикла, карбоксильный углерод двухуглеродного ацетильного радикала помечен звездочкой, а метильный углерод — точкой. Два атома углерода, которые уходят в виде CO_2 за один оборот цикла, принадлежат не молекуле ацетил-CoA, только что вступившей в цикл, а той части молекулы цитрата, которая образовалась из оксалоацетата. Однако по завершении одного оборота меченые атомы углерода оказываются в регенерируемом оксалоацетате и далее, в ходе второго оборота цикла, попадают в CO_2. Сукцинат является симметричным соединением, и две его карбоксильные группы для сукцинатдегидрогеназы неразличимы, поэтому на данной стадии происходит «рандомизация» (случайное распределение) метки, и после одного цикла все четыре атома углерода молекулы оксалоацетата оказываются мечеными. В процессе глюконеогенеза часть метки из оксалоацетата включается в глюкозу и в гликоген (см. рис. 20.1). Обсуждение стереохимических аспектов цикла лимонной кислоты приведено в обзоре Гревилля (Greville, 1968). На рисунке показаны также места ингибирования цикла (⊖) фторацетатом, малонатом и арсенатом.

Одним из субстратов реакций является GDP (или IDP), из которого в присутствии неорганического фосфата образуется GTP (ITP). Это — единственная стадия цикла лимонной кислоты, в ходе которой **генерируется высокоэнергетическая фосфатная связь на субстратном уровне**; при окислительном декарбоксилировании α-кетоглутарата потенциальное количество свободной энергии достаточно для образования NADH и высокоэнергетической фосфатной связи. В реакции, катализируемой фосфокиназой, ATP может образовываться как из GTP, так и из ITP. Например:

$$GTP + ADP \leftarrow\rightarrow GDP + ATP.$$

В альтернативной реакции, протекающей во внепеченочных тканях и катализируемой **сукцинил-CoA-ацетоацетат-CoA-трансферазой (тиофоразой)**, сукцинил-CoA превращается в сукцинат сопряженно с превращением ацетоацетата в ацетоацетил-CoA (см. с. 290). В печени имеется деацилазная активность, обеспечивающая гидролиз части сукцинил-CoA с образованием сукцината и CoA.

Далее сукцинат дегидрогенируется, затем присоединяется молекула воды, и следует еще одна стадия дегидрогенирования, приводящая к регенерации оксалоацетата:

$$\text{Сукцинат} + FAD \leftarrow\rightarrow \text{Фумарат} + FADH_2.$$

Первое дегидрогенирование катализируется сукцинатдегидрогеназой, связанной с внутренней поверхностью внутренней митохондриальной мембраны. Это — единственная дегидрогеназная реакция цикла лимонной кислоты, в ходе которой осуществляется **прямой перенос водорода с субстрата на флавопротеин без участия NAD^+**. Фермент содержит FAD и железо-серный (Fe:S) белок. В результате дегидрогенирования образуется фумарат. Как показали эксперименты с использованием изотопов, фермент стереоспецифичен к *транс*-атомам водорода метиленовых групп сукцината. Добавление малоната или оксалоацетата ингибирует сукцинатдегидрогеназу, что приводит к накоплению сукцината.

Фумараза (фумаратгидратаза) катализирует присоединение воды к фумарату с образованием малата:

$$\text{Фумарат} + H_2O \leftarrow\rightarrow \text{L-Малат}.$$

Фумараза специфична к L-изомеру малата, она катализирует присоединение компонентов молекулы воды по двойной связи фумарата в *транс*-конфигурации. **Малатдегидрогеназа** катализирует превращение малата в оксалоацетат, реакция идет с участием NAD^+:

$$\text{L-Малат} + NAD^+ \leftarrow\rightarrow \text{Оксалоацетат} + NADH + H^+.$$

Хотя равновесие этой реакции сильно сдвинуто в направлении малата, реально она протекает в направлении оксалоацетата, поскольку он вместе с NADH постоянно потребляется в других реакциях.

Ферменты цикла лимонной кислоты, за исключением α-кетоглутарат- и сукцинатдегидрогеназы, обнаруживаются и вне митохондрий. Однако некоторые из этих ферментов (например, малатдегидрогеназа) отличаются от соответствующих митохондриальных ферментов.

ЭНЕРГЕТИКА ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

В результате окисления, катализируемого дегидрогеназами цикла лимонной кислоты, на каждую катаболизируемую за период одного цикла молекулу ацетил-CoA образуются **три молекулы NADH и одна молекула $FADH_2$**. Эти восстановительные эквиваленты передаются в дыхательную цепь, локализованную во внутренней митохондриальной мембране (рис. 17.2). При прохождении по цепи восстановительные эквиваленты NADH генерируют три высокоэнергетические фосфатные связи посредством образования ATP из ADP в процессе окислительного фосфорилирования (см. гл. 13). За счет $FADH_2$ генерируются только две высокоэнергетические фосфатные связи, поскольку $FADH_2$ переносит восстановительные эквиваленты на кофермент Q и, следовательно, в обход первого участка окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи (см. рис. 13.6). Еще один высокоэнергетический фосфат генерируется на одном из участков цикла лимонной кислоты, т. е. на субстратном уровне, при превращении сукцинил-CoA в сукцинат. Таким образом, **за период каждого цикла образуется 12 новых высокоэнергетических фосфатных связей** (табл. 17.1).

Таблица 17.1. Образование высокоэнергетических фосфатных связей при функционировании цикла лимонной кислоты

Фермент, катализирующий реакцию	Место образования ~Ⓟ и характер сопряженного процесса	Число образовавшихся ~Ⓟ
Изоцитратдегидрогеназа	Окисление NADH в дыхательной цепи	3
α-Кетоглутаратдегидрогеназа	Окисление NADH в дыхательной цепи	3
Сукцинаттиокиназа	Окисление на субстратном уровне	1
Сукцинатдегидрогеназа	Окисление $FADH_2$ в дыхательной цепи	2
Малатдегидрогеназа	Окисление NADH в дыхательной цепи	3
	Итого	12

РОЛЬ ВИТАМИНОВ В ЦИКЛЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

В цикле лимонной кислоты выполняют специфические функции четыре водорастворимых витамина группы В.

1) **Рибофлавин** входит в состав **флавинадениндинуклеотида (FAD)**, который является кофактором α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса и сукцинатдегидрогеназы. 2) **Ниацин** входит в состав **никотинамидадениндинуклеотида (NAD)**, который является коферментом трех дегидрогеназ цикла: **изоцитратдегидрогеназы, α-кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы.** 3) **Тиамин (витамин B_1)** входит в состав тиаминдифосфата, который является коферментом α-кетоглутаратдегидрогеназы. 4) **Пантотеновая кислота** входит в состав **кофермента** А, который является кофактором, связывающим «активные» ацильные остатки, например, в ацетил-CoA или сукцинил-CoA. (Подробнее о рибофлавине и ниацине см. с. 121—123)

Тиамин (витамин B_1)

Структура тиамина показана на рис. 17.4. АТР-зависимая тиаминпирофосфотрансфераза, присутствующая в мозге и в печени, превращает тиамин в его активную форму, тиаминдифосфат (тиаминпирофосфат).

Тиаминдифосфат служит коферментом в реакциях, в которых происходит перенос активированных альдегидных групп. Имеется два типа таких реакций: 1) **окислительное декарбоксилирование** α-кетокислот (α-кетоглутарата, пирувата и α-кетоаналогов лейцина, изолейцина и валина) и 2) **транскетолазные реакции** (например, реакции пентозофосфатного пути). **При недостатке тиамина** все эти реакции затормаживаются (см. гл. 53).

Роль тиаминдифосфата в функционировании пируватдегидрогеназного комплекса показана на рис. 18.5; аналогичную роль тиаминдифосфат играет и в α-кетоглутаратдегидрогеназной реакции.

2,5-Диметил-6-аминопиримидин　2-Метил-5-гидроксиэтилтиазол

Рис. 17.4. Тиамин. В тиаминдифосфате –OH-группа замещена пирофосфатом.

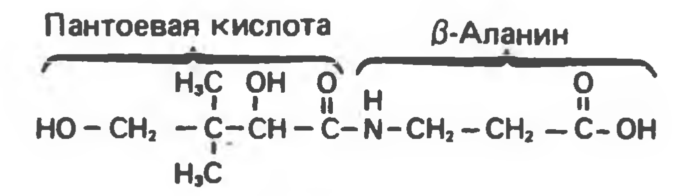


Рис. 17.5. Пантотеновая кислота.

Пантотеновая кислота

Пантотеновая кислота является амидом, образованным пантоевой кислотой и β-аланином (рис. 17.5). Она легко всасывается в кишечнике и затем фосфорилируется АТР с образованием 4′-фосфопантотената (рис. 17.6). На пути превращения в активный кофермент (**кофермент А**) к фосфопантотенату присоединяется цистеин, затем отщепляется карбоксильная группа последнего (что равносильно присоединению тиоэтаноламина), в результате образуется 4′-фосфопантетеин. Подобно многим коферментам, в состав которых входят водорастворимые витамины, активная форма пантотената содержит адениловый нуклеотид; 4′-фосфопантетеин аденилируется с образованием дефосфокофермента А. На конечной стадии АТР фосфорилирует дефосфокофермент А по 3′-гидроксильной группе рибозы с образованием кофермента А. **Тиоловая группа функционирует как переносчик ацильных групп**; эту роль она выполняет в реакциях окисления жирных кислот и их синтеза, ацетилирования и в рассмотренных выше процессах окислительного декарбоксилирования, в которых участвует также тиаминдифосфат. Связь между ацильной группой и атомом серы также является **высокоэнергетической**; энергетически она эквивалентна макроэргической связи в АТР. Образование такой высокоэнергетической связи предполагает поступление энергии либо от сопряженной экзергонической реакции, либо за счет высокоэнергетической фосфатной или тиоэфирной связи. Структуру свободного (т.е. восстановленного) кофермента А принято сокращенно записывать в виде CoA·SH, отмечая реактивную SH-группу кофермента.

АМФИБОЛИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Некоторые метаболические пути оканчиваются метаболитами, входящими в состав цикла; другие же, наоборот, берут начало от его метаболитов. Речь идет о процессах глюконеогенеза, переаминирования, дезаминирования и синтеза жирных кислот. Эти процессы более подробно рассмотрены в последующих главах, ниже кратко охарактеризована их связь с реакциями цикла.

Глюконеогенез, переаминирование и дезаминирование

Все главные соединения, участвующие в цикле, от цитрата до оксалоацетата являются потенциально глюкогенными. И в печени, и в почках из них может образовываться глюкоза, поскольку в этих органах имеется полный набор ферментов, необходимых для глюконеогенеза (см. с. 196). Ключевым ферментом процесса глюконеогенеза является **фосфоенолпируваткарбоксикиназа**, катализирующая декарбоксилирование оксалоацетата (при участии GTP в качестве источника высокоэнергетического фосфата) с образованием фосфоенолпирувата (рис. 17.7):

$$\text{Оксалоацетат} + \text{GTP} \rightarrow \text{Фосфоенолпируват} + CO_2 + \text{GDP}.$$

Поступление соединений в цикл осуществляется в результате нескольких различных реакций. Одной из наиболее существенных является образование оксалоацетата путем карбоксилирования пирувата, катализируемого **пируваткарбоксилазой**:

$$\text{ATP} + CO_2 + H_2O + \text{пируват} \rightarrow \text{оксалоацетат} + \text{ADP} + P_i.$$

Эта реакция обеспечивает адекватные концентрации оксалоацетата при его конденсации с ацетил-СоА. Если концентрация ацетил-СоА увеличивается, он действует как аллостерический активатор пируваткарбоксилазы, ускоряя образование оксалоацетата. Лактат, являющийся важным субстратом глюконеогенеза, вступает в цикл после превращения сначала в пируват, а затем в оксалоацетат.

В реакциях, катализируемых **трансаминазами**, пируват образуется из аланина, оксалоацетат — из аспартата и α-кетоглутарат — из глутамата. Вследствие обратимости этих реакций цикл может служить источником углеродных скелетов при синтезе заменимых аминокислот. Например:

$$\text{Аспартат} + \text{Пируват} \leftrightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{Аланин},$$
$$\text{Глутамат} + \text{Пируват} \leftrightarrow \alpha\text{-Кетоглутарат} + \text{Аланин}.$$

Определенный вклад в глюконеогенез вносят и другие аминокислоты, поскольку после дезаминирования или переаминирования их углеродный скелет полностью или частично включается в цикл. Примерами служат аланин, цистеин, глицин, гидроксипролин, серин, треонин и триптофан, из которых образуется пируват; аргинин, гистидин, глутамин и пролин, из которых образуется глутамат и далее α-кетоглутарат; изолейцин, метионин и валин, из которых образуется сукцинил-СоА; из тирозина и фенилаланина образуется фумарат (рис. 17.7). Вещества, образующие пируват, либо полностью окисляются до CO_2 по пируватдегидрогеназному пути, ведущему к образованию ацетил-СоА, либо следуют по пути глюконеогенеза с образованием оксалоацетата в результате карбоксилирования.

Рис. 17.6. Синтез кофермента А из пантотеновой кислоты.

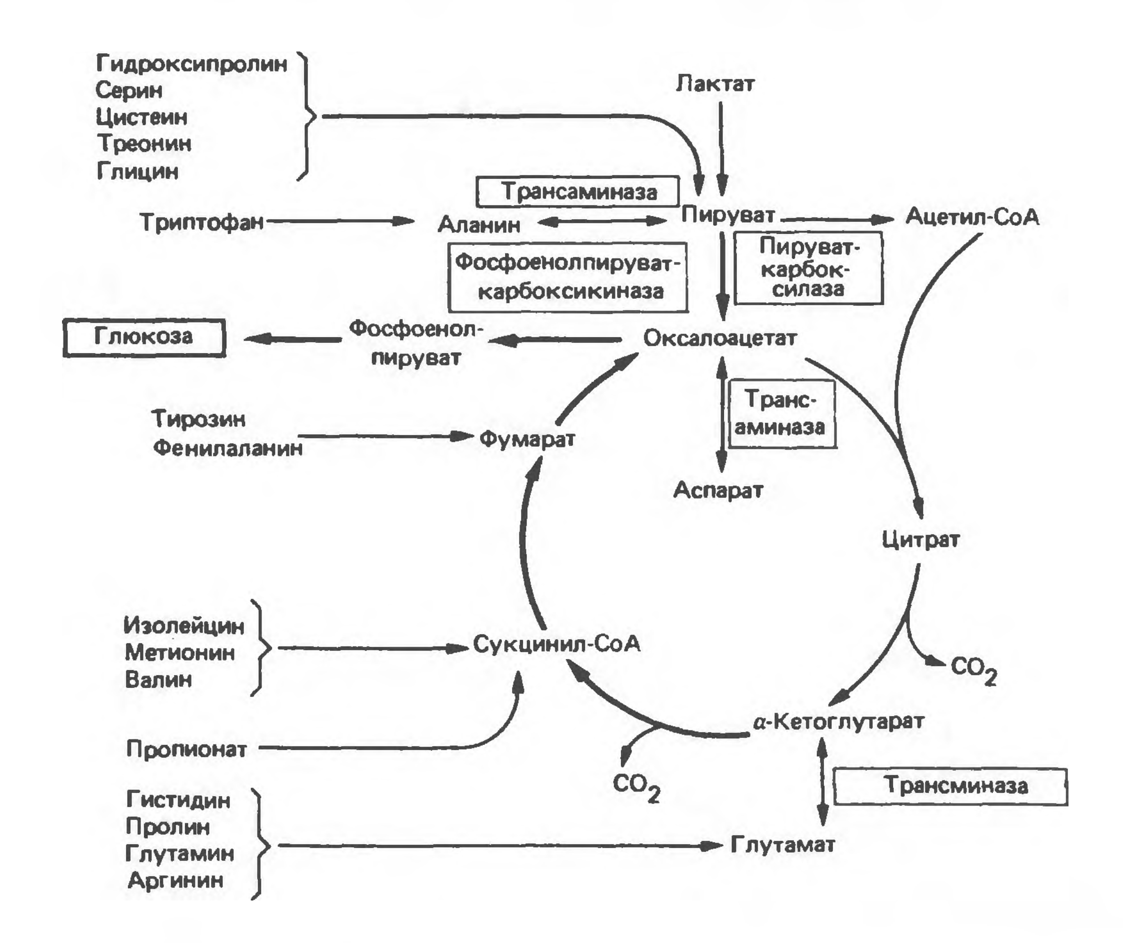


Рис. 17.7. Участие цикла лимонной кислоты в процессах переаминирования и глюконеогенеза. Жирными стрелками выделен главный путь глюконеогенеза.

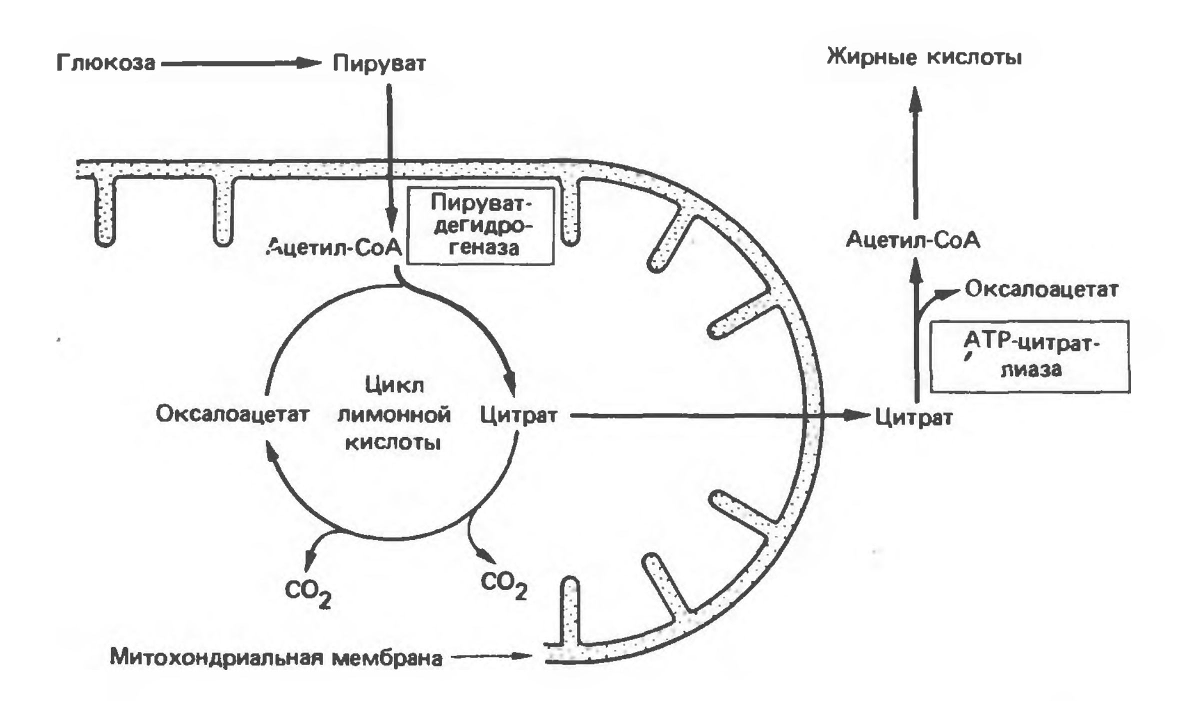


Рис. 17.8. Участие цикла лимонной кислоты в синтезе жирных кислот из глюкозы. См. также рис. 23.9.

Для жвачных животных особое значение имеет превращение пропионата (главного глюкогенного продукта процесса брожения, происходящего в рубце) в сукцинил-СоА по пути, идущему через образование метилмалонил-СоА (см. рис. 20.2).

Синтез жирных кислот (рис. 17.8)

Ацетил-СоА, образующийся из пирувата при действии пируватдегидрогеназы, служит главным строительным блоком при синтезе длинноцепочечных жирных кислот у млекопитающих (исключением являются жвачные животные, у которых ацетил-СоА образуется непосредственно из ацетата). Поскольку пируватдегидрогеназа является митохондриальным ферментом, а ферменты синтеза жирных кислот локализованы вне митохондрий, клетки должны осуществлять транспорт ацетил-СоА через непроницаемую для него митохондриальную мембрану. «Транспорт» осуществляется следующим образом: **ацетил-СоА** вступает в цикл лимонной кислоты, где участвует в образовании **цитрата**; последний **транспортируется** из митохондрии и в цитозоле снова превращается в ацетил-СоА в результате реакции, катализируемой ферментом **АТР-цитрат-лиазой**.

$$\text{Цитрат} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{Ацетил-Coa} + \text{Оксалоацетат} + \text{ADP} + P_i.$$

Регуляция цикла лимонной кислоты

Этот вопрос будет обсуждаться в гл. 22.

ЛИТЕРАТУРА

Boyer P. D. (ed.) The Enzymes, 3rd ed., Academic Press, 1971.
Goodwin T. W. (ed.) The Metabolic Roles of Citrate, Academic Press, 1968.
Greville G. D. Vol. 1, p. 297. In: Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, Dickens F., Randle P. J., Whelan W. J. (eds), Academic Press, 1968.
Lowenstein J. M. Vol. 1, p. 146. In: Metabolic Pathways, 3rd ed., Grenberg D. M. (ed.), Academic Press, 1967.
Lowenstein J. M. (ed.) Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation, Dekker, 1969.
Lowenstein J. M. (ed.) Citric Acid Cycle, Vol. 13. In: Methods in Enzymology, Academic Press, 1969.
Srere P. A. The enzymology of the formation and breakdown of citrate, Adv. Enzymol., 1975, **43**, 57.

Глава 18

Гликолиз и окисление пирувата

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Минимальные потребности в глюкозе имеют все ткани, но у некоторых из них (например, тканей мозга, эритроцитов) эти потребности весьма значительны. Гликолиз — это главный путь утилизации глюкозы; он протекает во всех клетках. Это уникальный путь, поскольку он может использовать кислород, если последний доступен (аэробные условия), но может протекать и в отсутствие кислорода (анаэробные условия).

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Гликолиз — это не только главный путь метаболизма глюкозы, ведущий к образованию ацетил-CoA и его окислению в цикле лимонной кислоты, но также и главный путь метаболизма фруктозы и галактозы, поступающих с пищей. Особенно важна в биомедицинском отношении способность гликолиза к образованию ATP в отсутствие кислорода; это позволяет поддерживать интенсивную работу скелетной мышцы в условиях недостаточной эффективности аэробного окисления; ткани с повышенной гликолитической активностью способны сохранять активность в периоды кислородного голодания. В то же время в сердечной мышце, адаптированной к работе в аэробных условиях, возможности осуществления гликолиза ограниченны, она тяжело переносит нарушение кровоснабжения (ишемию). Известно несколько болезней, обусловленных недостаточной активностью ферментов гликолиза (например, пируваткиназы); при этих состояниях наблюдается гемолитическая анемия. В быстро растущих раковых клетках гликолиз идет со скоростью, значительно превышающей возможности цикла лимонной кислоты. В результате образование пирувата превосходит его потребление. Это в свою очередь приводит к образованию избытка лактата и к локальному повышению кислотности в опухолевой ткани; эта особенность метаболизма иногда используется в терапии некоторых форм опухолей. Содержание молочной кислоты повышается также при недостаточной активности пируватдегидрогеназы.

ГЛИКОЛИТИЧЕСКИЙ ПУТЬ

Анаэробный гликолиз

Уже на ранних этапах изучения метаболизма углеводов было установлено, что процесс брожения в дрожжах во многом сходен с распадом гликогена в мышце. Исследования гликолитического пути проводили именно на этих двух системах.

При изучении биохимических изменений в ходе мышечного сокращения было установлено, что при функционировании мышцы в анаэробной (бескислородной) среде происходит **исчезновение гликогена и появление пирувата и лактата** в качестве главных конечных продуктов. Если затем обеспечить поступление кислорода, наблюдается «аэробное восстановление»: образуется гликоген, и исчезают пируват и лактат. При работе мышцы в аэробных условиях накопления лактата не происходит, а пируват окисляется далее, превращаясь в CO_2 и H_2O. В результате этих наблюдений утвердилось разделение метаболизма углеводов на анаэробную и аэробную фазы. Однако это разделение носит условный характер, так как реакции гликолиза в присутствии кислорода и в его отсутствие одни и те же,— различия касаются лишь их скорости и конечных продуктов. При недостатке кислорода реокисление NADH, образовавшегося из NAD в ходе гликолиза, осуществляется путем сопряжения с восстановлением пирувата в лактат; образовавшийся при этом NAD обеспечивает дальнейшее протекание реакций гликолиза (рис. 18.1). Таким образом, гликолиз может идти в анаэробных условиях, но за это приходится расплачиваться, получая меньшее количество энергии на моль утилизированной глюкозы. Следовательно, **для производства данного количества энергии путем гликолиза при анаэробных условиях требуются бóльшие количества глюкозы, чем при аэробных**.

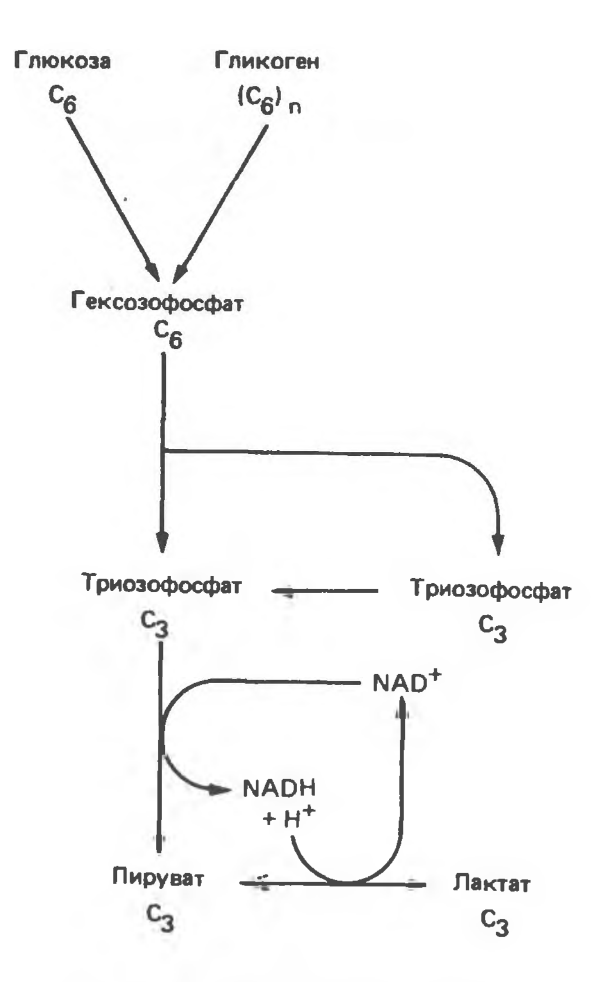


Рис. 18.1. Общая схема гликолиза.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ СТАДИИ ГЛИКОЛИЗА

Суммарное уравнение гликолиза, завершающегося образованием лактата, следующее:

Глюкоза + 2ADP + $2P_i$ → 2L-Лактат + 2ATP + $2H_2O$.

Все ферменты гликолитического пути (рис. 18.2) находятся во внемитохондриальной растворимой клеточной фракции (цитозоле). Они катализируют реакции превращения глюкозы в пируват и лактат, которые протекают в следующей последовательности.

Гликолитический путь превращения глюкозы начинается с ее фосфорилирования в глюкозо-6-фосфат. Эта реакция катализируется ферментом **гексокиназой**; в паренхиматозных клетках печени эту функцию выполняет индуцируемый фермент **глюкокиназа**, активность которого зависит от характера питания. Донором фосфата служит ATP в виде комплекса Mg—ATP, что характерно и для многих других реакций фосфорилирования. При этом расходуется одна высокоэнергетическая фосфатная связь ATP и образуется ADP. Реакция сопровождается значительными потерями свободной энергии в форме теплоты. Поэтому при физиологических условиях эта реакция является необратимой. Продукт реакции глюкозо-6-фосфат является аллостерическим ингибитором гексокиназы:

$$\alpha\text{-D-Глюкоза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \alpha\text{-D-Глюкозо-6-фосфат} + \text{ADP}.$$

Гексокиназа, присутствующая во всех тканях, за исключением паренхимы печени, имеет высокое сродство (низкое K_M) к своему субстрату, глюкозе; ее функция состоит в том, чтобы обеспечить захват тканью глюкозы даже при низких концентрациях последней в крови. Фосфорилируя практически всю поступающую в клетку глюкозу, гексокиназа поддерживает значительный градиент концентрации глюкозы между кровью и внутриклеточной средой. Фермент действует как на α-, так и на β-аномеры глюкозы; он фосфорилирует также и другие гексозы, но со значительно меньшей скоростью.

Функция глюкокиназы состоит в «захватывании» глюкозы из кровотока после приема пищи (когда концентрация глюкозы в крови повышается). В отличие от гексокиназы она имеет высокое значение K_M для глюкозы и эффективно функционирует при концентрации глюкозы в крови выше 100 мг/100 мл (см. рис. 22.7). Глюкокиназа специфична к глюкозе.

Глюкозо-6-фосфат занимает важное положение в области стыковки ряда метаболических путей (гликолиз, глюконеогенез, пентозофосфатный путь, гликогенез и гликогенолиз) (рис. 18.2). В ходе гликолиза он превращается во фруктозо-6-фосфат при участии **фосфогексозоизомеразы**, при этом происходит альдо-кето-изомеризация. Фермент действует только на α-аномер глюкозо-6-фосфата:

α-D-Глюкозо-6-фосфат ↔ α-D-Фруктозо-6-фосфат.

Далее следует еще одно фосфорилирование, осуществляемое ATP; оно катализируется **фосфофруктокиназой (фосфофруктокиназа-1)** с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата. Фосфофруктокиназа также является индуцируемым ферментом; считается, что она играет главную роль в регуляции скорости гликолиза. Реакция, катализируемая фосфофруктокиназой, также является необратимой при физиологических условиях:

D-Фруктозо-6-фосфат + ATP → D-Фруктозо-1,6-бисфосфат + ADP.

Фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется **альдолазой** (фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолазой) на два триозофосфата: глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат:

D-Фруктозо-1,6-бисфосфат ↔ D-Глицеральдегид-3-фосфат + Дигидроксиацетонфосфат.

Описано несколько различных альдолаз, и все они состоят из четырех субъединиц. В большинстве тканей находится альдолаза А, в печени и почках имеется также альдолаза В. В клетке фруктозофосфаты

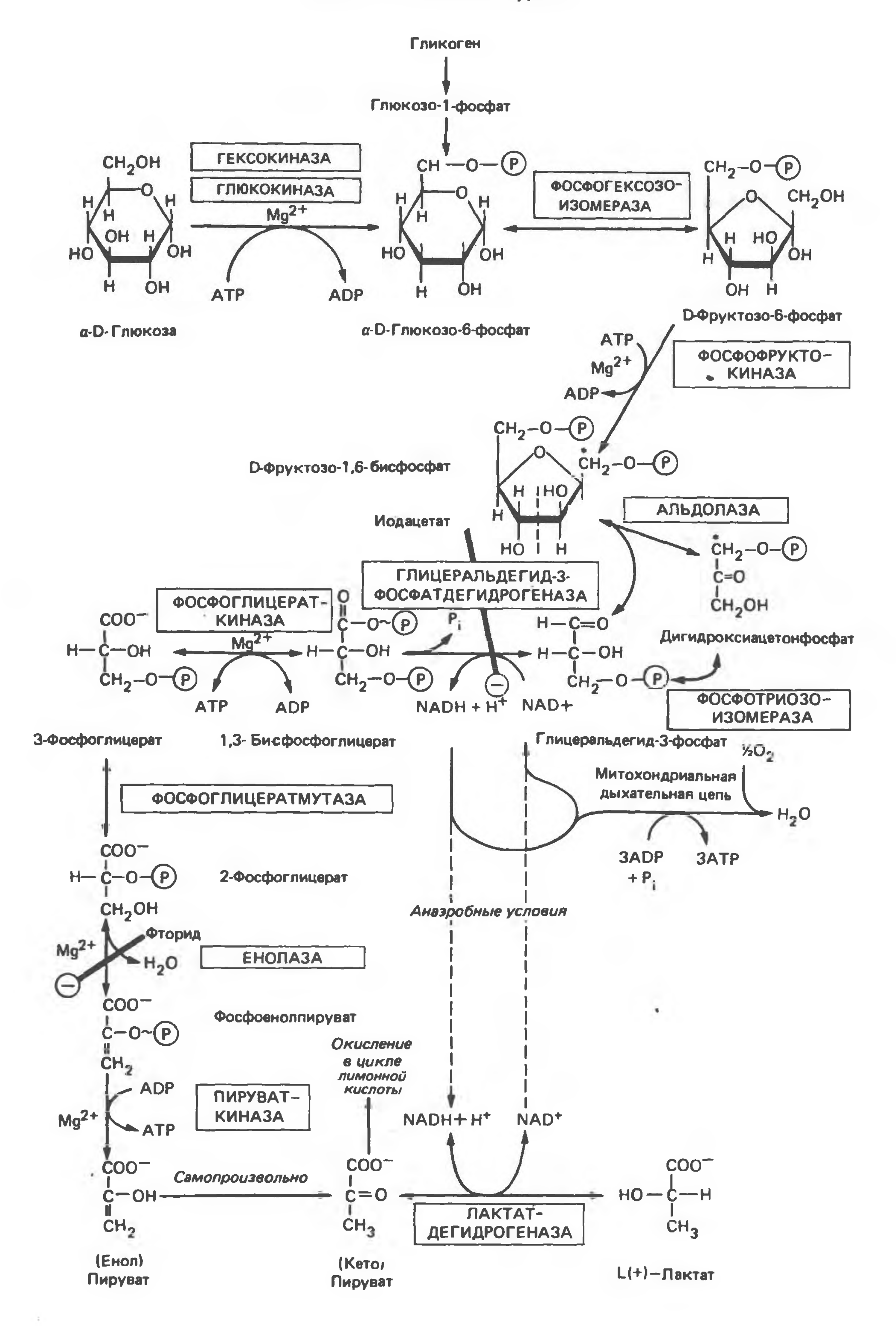


Рис. 18.2. Последовательность реакций гликолиза. Обозначения: Ⓟ — ($-PO_3^{2-}$); P_i — $HOPO_3^{2-}$; ⊖ — ингибирование. Атомы углерода 1—3 в молекуле фруктозобисфосфата участвуют в образовании дигидроксиацетонфосфата, а атомы углерода 4—6 — в образовании глицеральдегид-3-фосфата.

находятся преимущественно в фуранозной форме, но фосфогексозоизомераза, фосфофруктокиназа и альдолаза действуют на молекулы, имеющие «открытую» линейную конфигурацию.

Глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат превращаются друг в друга при участии фермента **фосфотриозоизомеразы**:

D-Глицеральдегид-3-фосфат ↔ Дигидроксиацетонфосфат.

Следующей стадией гликолиза является окисление глицеральдегид-3-фосфата с образованием 1,3-бисфосфоглицерата; дигидроксиацетонфосфат при участии фосфотриозоизомеразы также окисляется в 1,3-бисфосфоглицерат, проходя через стадию образования глицеральдегид-3-фосфата:

D-Глицеральдегид-3-фосфат + NAD^+ + P_i ↔ 1,3-Бисфосфоглицерат + NADH + H^+.

Фермент, катализирующий эту реакцию,— NAD-зависимая **глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа**. В структурном плане она состоит из четырех идентичных полипептидов, образующих тетрамер. Каждый полипептид содержит по четыре — SH-группы, принадлежащие остаткам цистеина. Одна из них находится в активном центре фермента. Полагают, что она принимает участие в окислении глицеральдегид-3-фосфата. Сначала субстрат соединяется с остатком цистеина дегидрогеназы, образуя тиополуацеталь, который окисляется в тиоловый эфир; атомы водорода, отщепленные при этом окислении, переносятся на связанный с ферментом NAD. Образующийся NADH связан с ферментом менее прочно, чем NAD, и поэтому легко замещается другой молекулой NAD. Реакция завершается фосфоролизом тиоэфирной связи с присоединением неорганического фосфата P_i; при этом образуются 1,3-бисфосфоглицерат и свободный фермент с —SH-группой (рис. 18.3). Потенциальная энергия процесса окисления резервируется сначала в высокоэнергетической тиоэфирной связи, а после фосфоролиза — в высокоэнергетической фосфатной связи 1,3-бисфосфоглицерата, находящейся в положении 1. Высокоэнергетический фосфат переходит далее в состав ATP при участии фермента **фосфоглицераткиназы**, при этом образуется 3-фосфоглицерат:

1,3-Бисфосфоглицерат + ADP ↔ 3-Фосфоглицерат + ATP.

Поскольку на каждую молекулу глюкозы, участвующую в гликолизе, образуются две молекулы триозы, то на рассмотренной стадии образуются две молекулы ATP на молекулу глюкозы. Здесь мы имеем пример фосфорилирования «на субстратном уровне».

В присутствии арсената, который конкурирует

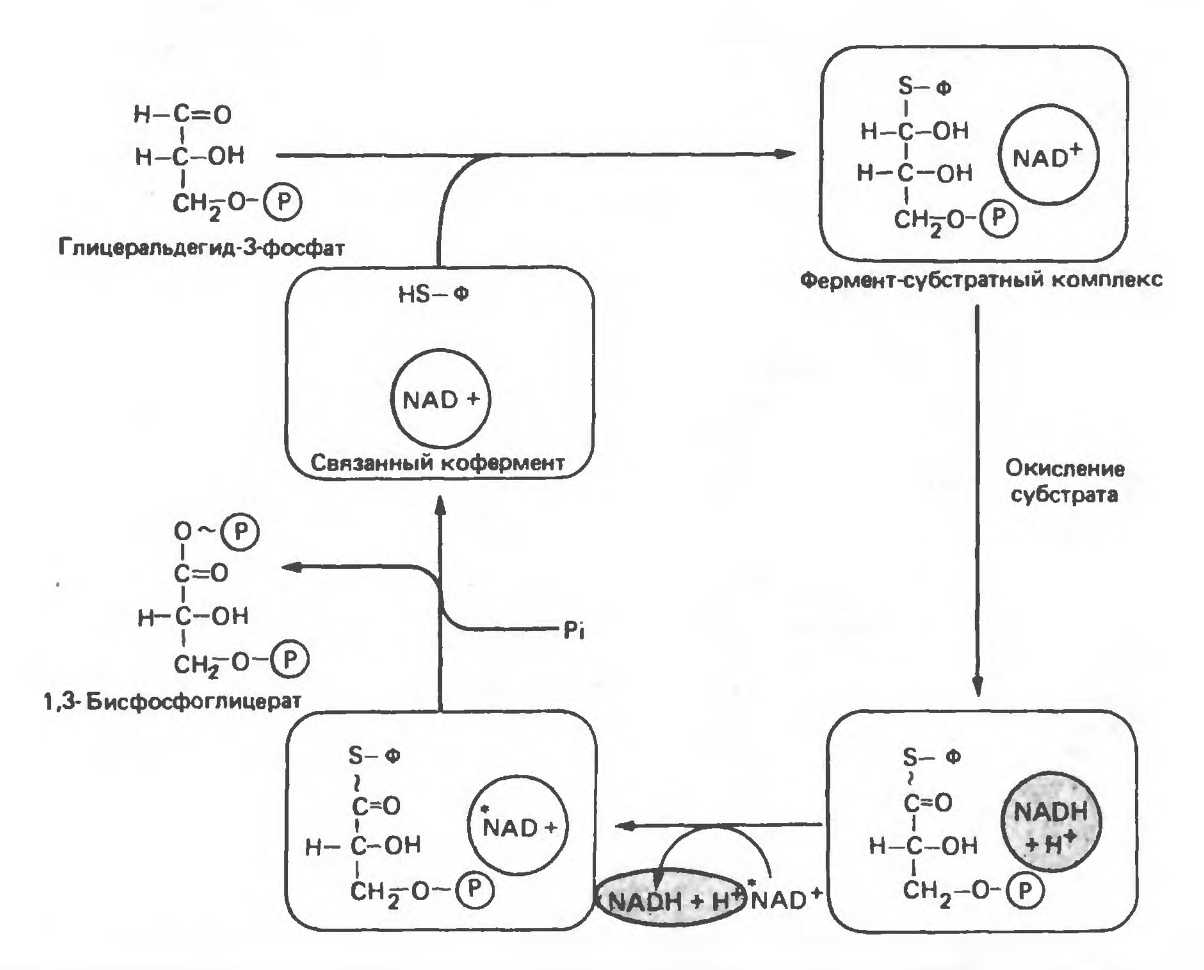


Рис. 18.3. Окисление глицеральдегид-3-фосфата. Ф — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Фермент ингибируется реагентом на – SH-группы **иодацетатом**, который, следовательно, способен подавлять гликолиз.

с неорганическим фосфатом (P_i), образуется 1-арсено-3-фосфоглицерат, самопроизвольно гидролизующийся до 3-фосфоглицерата с выделением теплоты, но без образования ATP. Это важный пример способности арсената разобщать процессы окисления и фосфорилирования.

Образовавшийся на предыдущей стадии 3-фосфоглицерат превращается в 2-фосфоглицерат при участии фермента **фосфоглицератмутазы**. Полагают, что на промежуточной стадии реакции образуется 2,3-бисфосфоглицерат (DPG):

3-Фосфоглицерат $\leftrightarrow$ 2-Фосфоглицерат.

На следующей стадии, катализируемой **енолазой**, происходит отщепление молекулы воды и перераспределение энергии внутри молекулы, при этом фосфат в положении 2 переходит в высокоэнергетическое состояние; продуктом реакции является фосфоенолпируват. Енолаза ингибируется ионами **фторида**; этим пользуются в тех случаях, когда необходимо остановить гликолиз, например перед определением содержания глюкозы в крови. Енолаза нуждается в ионах Mg^{2+} или Mn^{2+}:

2-Фосфоглицерат $\leftrightarrow$ Фосфоенолпируват + H_2O.

Высокоэнергетический фосфат фосфоенолпирувата переносится на ADP ферментом **пируваткиназой**; на этой стадии образуются еще две молекулы ATP на молекулу глюкозы. Образующийся в ходе реакции енолпируват самопроизвольно переходит в кетоформу, т. е. пируват. Это — еще одна неравновесная реакция, сопровождающаяся значительной потерей свободной энергии в форме теплоты; она является физиологически необратимой:

Фосфоенолпируват + ADP $\rightarrow$ Пируват + ATP.

В зависимости от окислительно-восстановительного состояния ткани дальнейший процесс может идти по одному из двух путей. **В анаэробных условиях** реокисление NADH путем переноса восстановительных эквивалентов на дыхательную цепь и далее на кислород происходить не может. Поэтому NADH восстанавливает пируват в лактат, эта реакция катализируется **лактатдегидрогеназой**. Описано несколько изозимов этого фермента, определение их имеет клиническое значение.

Пируват + NADH + H^+ $\leftrightarrow$ L-Лактат + NAD^+.

Реокисление NADH путем образования лактата обеспечивает возможность протекания гликолиза в отсутствие кислорода, **поскольку поставляется NAD^+**, необходимый для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной реакции. Таким образом, в тканях, функционирующих **в условиях гипоксии, наблюдается образование лактата** (рис. 18.2). Это в особенности справедливо в отношении скелетной мышцы, интенсивность работы которой в определенных пределах не зависит от поступления кислорода. Образующийся лактат может быть обнаружен в тканях, крови и моче. **Гликолиз в эритроцитах** даже в аэробных условиях **всегда завершается образованием лактата**, поскольку в этих клетках отсутствуют митохондрии, содержащие ферментные системы аэробного окисления пирувата. Эритроциты млекопитающих уникальны в том отношении, что около 90% их потребностей в энергии обеспечивается гликолизом. Помимо скелетной мышцы и эритроцитов ряд других тканей (мозг, желудочно-кишечный тракт, мозговой слой почек, сетчатка и кожа) в норме частично используют энергию гликолиза и образуют молочную кислоту. Печень, почки и сердце обычно утилизируют лактат, но в условиях гипоксии образуют его.

Хотя бóльшая часть гликолитических реакций обратима, три из них носят ярко выраженный экзергонический характер и поэтому могут рассматриваться как физиологически необратимые. Это реакции, катализируемые **гексокиназой** (и глюкокиназой), **фосфофруктокиназой** и **пируваткиназой**; они служат главными участками, на которых происходит регуляция гликолиза. Клетки, способные направить движение метаболитов гликолитического пути в направлении синтеза (глюконеогенез), используют различные ферментные системы, обеспечивающие протекание процесса в обход упомянутых выше необратимых стадий. Об этом будет подробнее сказано ниже, когда будут обсуждаться процессы глюконеогенеза.

2,3-Бисфосфоглицератный цикл

В эритроцитах многих млекопитающих имеется фермент, позволяющий направить процесс в обход стадии, катализируемой фосфоглицераткиназой; при этом свободная энергия, обусловленная присутствием высокоэнергетического фосфата в молекуле 1,3-бисфосфоглицерата, рассеивается в форме теплоты (рис. 18.4). Дополнительный фермент **бисфосфоглицератмутаза** катализирует превращение 1,3-бисфосфоглицерата в 2,3-бисфосфоглицерат, последний далее превращается в 3-фосфоглицерат при участии 2,3-бисфосфоглицератфосфатазы (принято считать, что этой активностью обладает фосфоглицератмутаза). Потеря на этой стадии высокоэнергетического фосфата означает, что процесс гликолиза более не сопровождается производством ATP. В этом может заключаться определенное преимущество, поскольку даже в тех случаях, когда потребности в ATP минимальны, гликолиз может продолжаться. Образующийся 2,3-бисфосфоглицерат связывается с гемоглобином, понижая сродство последнего к кислороду, т. е. сдвигает кривую диссоциации оксигемоглобина вправо. Таким образом, **присутствие 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах способствует диссоциации кислорода из оксигемоглобина и переходу его в ткани** (см. гл. 6).

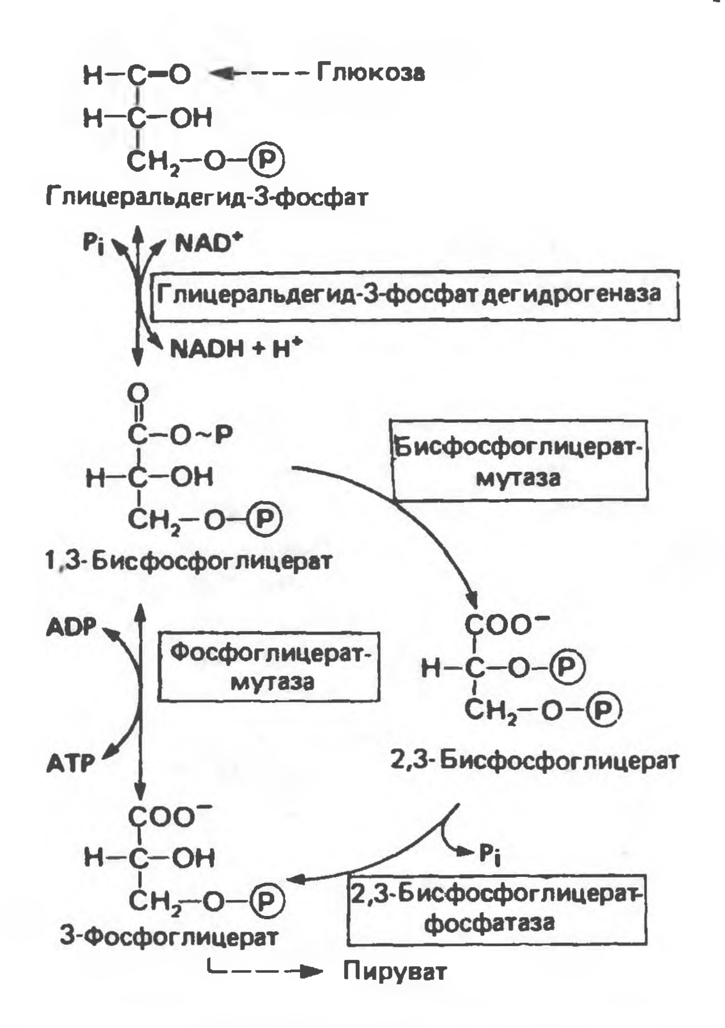


Рис. 18.4. 2,3-Бисфосфоглицератный цикл в эритроцитах.

ОКИСЛЕНИЕ ПИРУВАТА В АЦЕТИЛ-СоА

Прежде чем пируват вступает в цикл лимонной кислоты, он должен быть транспортирован в митохондрию; специальный переносчик обеспечивает перенос молекул пирувата через внутреннюю митохондриальную мембрану по механизму симпорта с протоном (см. рис. 13.15). Внутри митохондрии происходит окислительное декарбоксилирование пирувата и образование ацетил-СоА. Эта реакция катализируется несколькими различными ферментами, работающими в определенной последовательности и объединенными в мультиферментный **пируватдегидрогеназный комплекс**, аналогичный α-кетоглутаратдегидрогеназному комплексу, участвующему в цикле лимонной кислоты (см. с. 174). Пируват декарбоксилируется в присутствии тиаминдифосфата, при этом происходит перенос гидроксиэтильной группы на тиазольное кольцо связанного с ферментом тиаминдифосфата; далее это гидроксиэтильное производное вступает в реакцию с окисленным липоамидом с образованием ацетиллипоамида (рис. 18.5). В присутствии **дигидролипоилтрансферазы** ацетиллипоамид реагирует с коферментом А, образуя ацетил-СоА и восстановленный липоамид. Завершается цикл реокислением липоамида в реакции с флавопротеином в присутствии **дигидролипоилдегидрогеназы**. Восстановленный флавопротеин окисляется NAD, который в свою очередь передает восстановительные эквиваленты на дыхательную цепь:

$$\text{Пируват} + NAD^+ + CoA \rightarrow \text{Ацетил-CoA} + NADH + H^+ + CO_2.$$

В пируватдегидрогеназный комплекс входит примерно 29 молекул пируватдегидрогеназы, около 8 молекул флавопротеина (дигидролипоилдегидрогеназы) и 1 молекула трансацетилазы. Перемещение индивидуальных ферментов в комплексе, по-видимому, ограничено, а интермедиаты не диссоциируют, оставаясь связанными с ферментами.

Следует отметить, что пируватдегидрогеназная система характеризуется большим отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом, который обеспечивает наряду с восстановлением кофермента (NADH) образование высокоэнергетической тиоэфирной связи в ацетил-СоА.

Клинические аспекты метаболизма пирувата

Арсенат, а также ионы ртути образуют комплексы с —SH-группами липоевой кислоты и ингибируют пируватдегидрогеназу; при недостаточном содержании тиамина в диете активность пируватдегидрогеназы снижается и пируват может накапливаться. Недостаток тиамина возникает у алкоголиков с нарушенным режимом питания; при введении им глюкозы может происходить быстрое накопление пирувата и лактата, приводящее к лактатацидозу, нередко с летальным исходом. У больных с наследственной недостаточностью пируватдегидрогеназы также может развиваться лактатацидоз, особенно после глюкозной нагрузки. Зарегистрированы мутации практически всех ферментов углеводного метаболизма, и в каждом случае их следствием является заболевание человека.

Энергетика окисления углеводов

При сжигании в калориметре 1 моль глюкозы с образованием CO_2 и H_2O выделяется приблизительно 2780 кДж теплоты. Когда окисление глюкозы происходит в тканях, часть высвобождаемой энергии не теряется в форме теплоты, а «улавливается» в виде высокоэнергетических фосфатных связей. На молекулу глюкозы, окисляющуюся до CO_2 и H_2O, образуется примерно 38 высокоэнергетических фосфатных связей. Если принять, что энергия высокоэнергетической связи равна 30,5 кДж, то суммарная энергия, запасаемая в форме АТР, составит 1159 кДж на 1 моль глюкозы (приблизительно 41,7% от энергии сгорания). Бóльшая часть АТР образуется в процессе окислительного фосфорилирования при окислении восстановленных коферментов дыхатель-

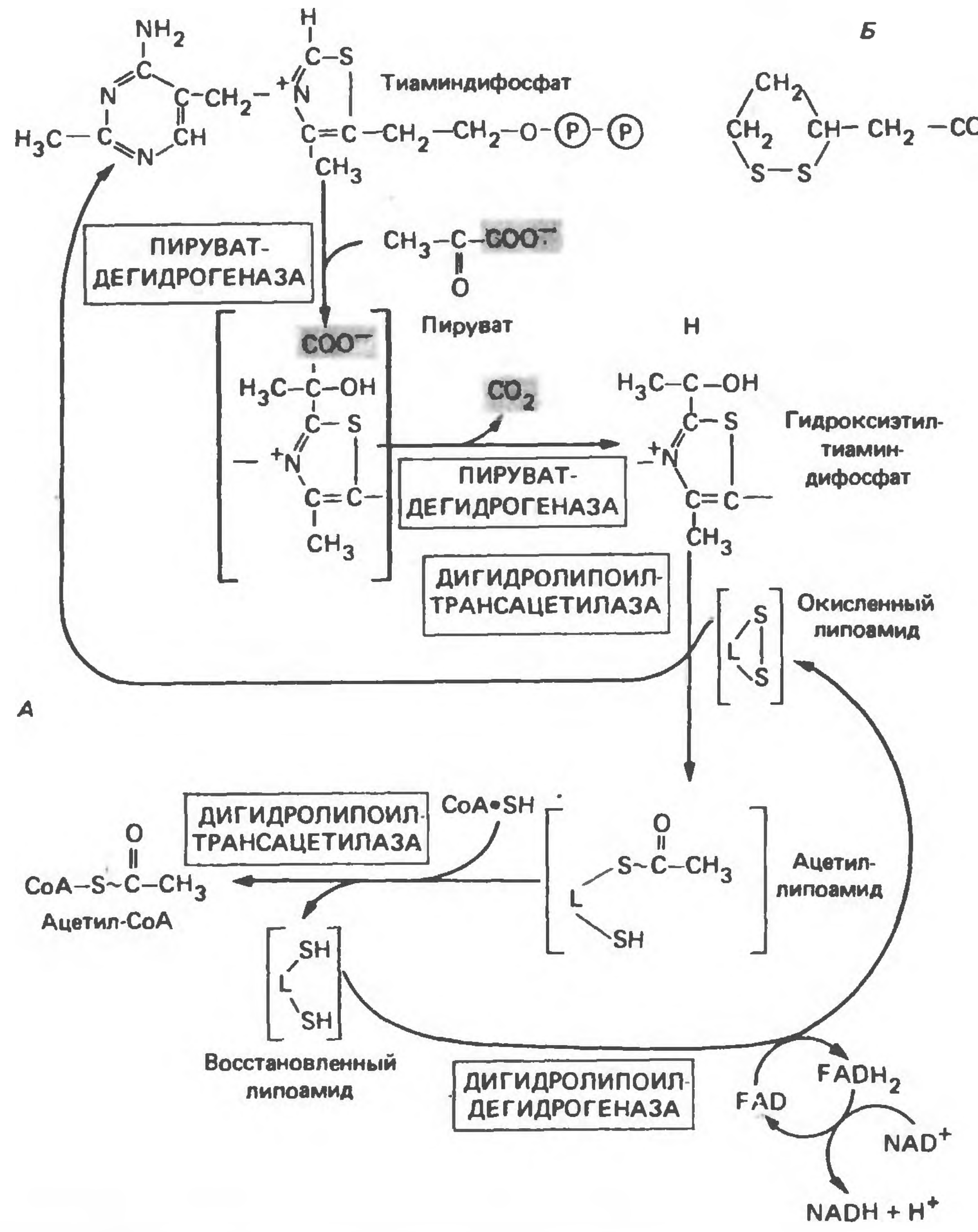


Рис. 18.5. *А* — окислительное декарбоксилирование пирувата пируватдегидрогеназным комплексом. *Б* — липоевая кислота. Она присоединяется амидной связью к остаткам лизина трансацетилазного компонента комплекса.

Таблица 18.1. Образование высокоэнергетических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы

Метаболический путь	Фермент	Место образования ~ Ⓟ и сопряженный процесс	Число связей ~ Ⓟ, образовавшихся на 1 моль глюкозы
Гликолиз	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Окисление 2 NADH в дыхательной цепи	6[1]
	Фосфоглицераткиназа	Окисление на субстратном уровне	2
	Пируваткиназа	Окисление на субстратном уровне	2
			10
С учетом расходования ATP в реакциях, катализируемых гексокиназой и фосфофруктокиназой			−2
			Итого 8
Цикл лимонной кислоты	Пируватдегидрогеназа	Окисление 2 NADH в дыхательной цепи	6
	Изоцитратдегидрогеназа	Окисление 2 NADH в дыхательной цепи	6
	α-Кетоглутаратдегидрогеназа	Окисление 2 NADH в дыхательной цепи	6
	Сукцинаттиокиназа	Окисление на субстратном уровне	2
	Сукцинатдегидрогеназа	Окисление 2 $FADH_2$ в дыхательной цепи	4
	Малатдегидрогеназа	Окисление 2 NADH в дыхательной цепи	6
			Итого 30
Всего на 1 моль глюкозы в аэробных условиях			38
Всего на 1 моль клюкозы в анаэробных условиях			2

[1] В предположении, что NADH, образовавшийся в ходе гликолиза, поступает в митохондрию с помощью малатного челночиого механизма (см. рис. 13.15). Если используется глицерофосфатный челночный механизм, образуется только 2 ~ Ⓟ на 1 моль NADH, и количество образовавшихся фосфатных связей будет уже не 38, а 36. Расчеты проведены без учета небольших потерь ATP при сопряженном переносе в митохондрию H^+ и пирувата и при аналогичном переносе H^+, свойственном малатному челночному механизму, на что уходит примерно 1 моль ATP.

ной цепью. Другая часть ATP образуется в результате фосфорилирования, происходящего «на субстратном уровне» (см. гл. 13). В табл. 18.1 даны реакции, в которых происходит образование высокоэнергетических фосфатов при катаболизме глюкозы, с указанием эффективности процесса в аэробных и анаэробных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

Blass J. P. Disorders of pyruvate metabolism, Neurology, 1978, **29**, 280.

Boyer P. D. (ed.) The Enzymes, 3rd ed., Vols. 5—9, Academic Press, 1972.

Dickens F., Randle P. J., Whelan W. J. (eds) Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, 2 vols., Academic Press, 1968.

Greenberg D. M. (ed.) Metabolic Pathways, 3rd ed., Vol. 1, Academic Press, 1967.

Randle P. J., Steiner D. F., Whelan W. J. (eds) Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, Vol. 3, Academic Press, 1981.

Veneziale C. M. (ed.) The Regulation of Carbohydrate Formation and Utilization in Mammals, University Park Press, 1981.

Глава 19

Метаболизм гликогена

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Гликоген — главная форма запасания углеводов у животных; в растениях эту роль играет крахмал. Гликоген запасается главным образом в печени (до 6% от массы печени) и в мышцах, где его содержание редко превышает 1% (табл. 19.1). Как и крахмал, гликоген является разветвленным полимером α-глюкозы (см. рис. 14.15).

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Функция мышечного гликогена состоит в том, что он является легкодоступным источником гексозных единиц, используемых в ходе гликолиза **в самой мышце**. Гликоген печени используется главным образом для поддержания **физиологических концентраций глюкозы в крови**, прежде всего в промежутках между приемами пищи. Через 12—18 ч после приема пищи запас гликогена в печени почти полностью истощается. Содержание мышечного гликогена заметно снижается только после продолжительной и напряженной физической работы. Повышенное содержание гликогена в мышцах может наблюдаться при диете с высоким содержанием углеводов, если перед этим запасы гликогена были снижены в результате высокой мышечной нагрузки. Под названием «болезни накопления гликогена» объединяют ряд наследственных болезней, при которых наблюдается нарушение мобилизации гликогена или отложение его в нефизиологических формах.

Таблица 19.1. Запасы углеводов в организме нормального взрослого человека (массой 70 кг) после приема пищи

Гликоген печени	4,0% = 72 г [1]	
Мышечный гликоген	0,7% = 245 г [2]	
Внеклеточная глюкоза	0,1% = 10 г [3]	
	Итого	327 г

[1] Масса печени 1800 г.
[2] Масса мышц 35 кг.
[3] Общий объем внеклеточной жидкости 10 л.

ГЛИКОГЕНЕЗ

Биосинтез гликогена (рис. 19.1)

Глюкоза фосфорилируется до глюкозо-6-фосфата, это та же реакция, которая является первой стадией гликолиза. Реакция катализируется в мышцах **гексокиназой**, а в печени — **глюкокиназой**. Глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат в результате реакции, катализируемой **фосфоглюкомутазой**. Этот фермент (Ф) находится в фосфорилированной форме, его фосфогруппа (Р) участвует в обратимой реакции, интермедиатом которой является глюкозо-1,6-бисфосфат:

Ф — Р + Глюкозо-6-фосфат ↔ Ф + Глюкозо-1,6-бисфосфат ↔ Ф — Р + Глюкозо-1-фосфат.

Далее глюкозо-1-фосфат реагирует с уридинтрифосфатом (UTP); в результате образуется активный нуклеотид **уридиндифосфатглюкоза** (UDPGlc)[1] (рис. 19.2).

Реакция между глюкозо-1-фосфатом и уридинтрифосфатом катализируется ферментом **UDPGlc-пирофосфорилазой:**

UTP + Глюкозо-1-фосфат ↔ UDPGlc + PP_i.

Последующий гидролиз неорганического пирофосфата, катализируемый **неорганической пирофосфатазой**, сдвигает равновесие реакции вправо.

При действии фермента **гликогенсинтазы** (или **глюкозилтрансферазы)** образуется гликозидная связь между атомом C_1 активированной глюкозы, находящейся в составе UDPGlc, и атомом C_4 концевого остатка глюкозы в гликогене с освобождением уридиндифосфата (UDP). Для инициирова-

[1] Известны и другие нуклеозиддифосфатсахара, например UDPGal. Кроме того, один и тот же сахар может быть связан с различными нуклеотидами. Например, глюкоза может быть связана с уридиновым (как в приведенном выше примере), гуанозиновым, тимидиновым, аденозиновым и цитидиновым нуклеотидами.

Рис. 19.1. Схема гликогенеза и гликогенолиза в печени. На включение одной молекулы глюкозы в состав гликогена расходуются две высокоэнергетические фосфатные связи. ⊕ — стимуляция; ⊖ — ингибирование. Инсулин понижает уровень cAMP только в том случае, если повышение уровня cAMP было вызвано глюкагоном или адреналином, т. е. по отношению к последним инсулин выступает как антагонист.

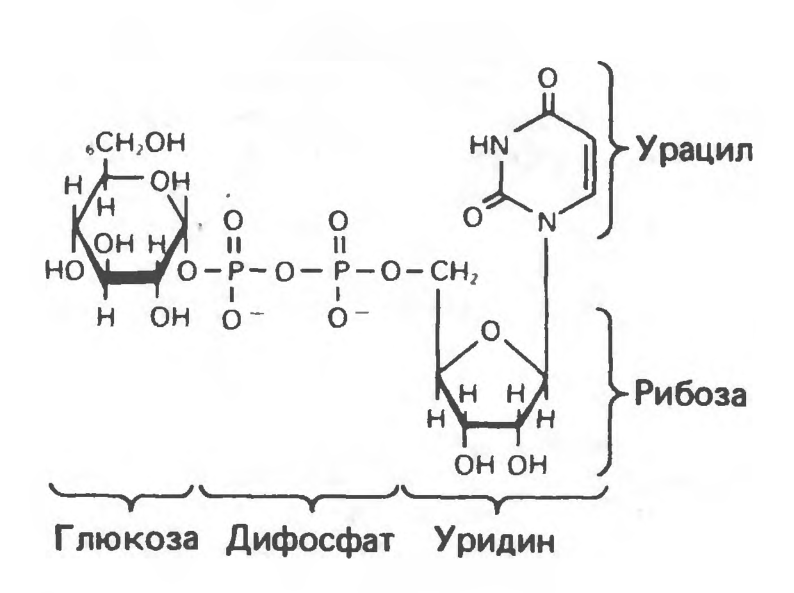


Рис. 19.2. Уридиндифосфатглюкоза (UDPGlc).

ния этой реакции требуется молекула гликогена в качестве «затравки». Эта затравка может синтезироваться на остове пептидной цепи подобно тому, как это происходит при синтезе других гликопротеинов (см. гл. 54):

$$\underset{}{\text{UDPGlc}} + \underset{\text{Гликоген}}{(C_6)_n} \rightarrow \text{UDP} + \underset{\text{Гликоген}}{(C_6)_{n+1}}.$$

Механизм ветвления

Присоединение остатка глюкозы к «затравочной» цепи гликогена происходит на внешнем, невосстанавливающем конце молекулы; «ветви» гликогенового «дерева» удлиняются путем последовательного образования **(1 → 4)-связей** (рис. 19.3). После того как длина линейного участка цепи достигнет как минимум 11 остатков глюкозы, **ветвящий (бранчинг) фермент (амило-[1 → 4] → [1 → 6]-трансглюкозидаза)** переносит фрагмент (1 → 4)-цепи (с минимальной длиной в 6 остатков глюкозы) на соседнюю цепь, присоединяя к ней переносимый фрагмент

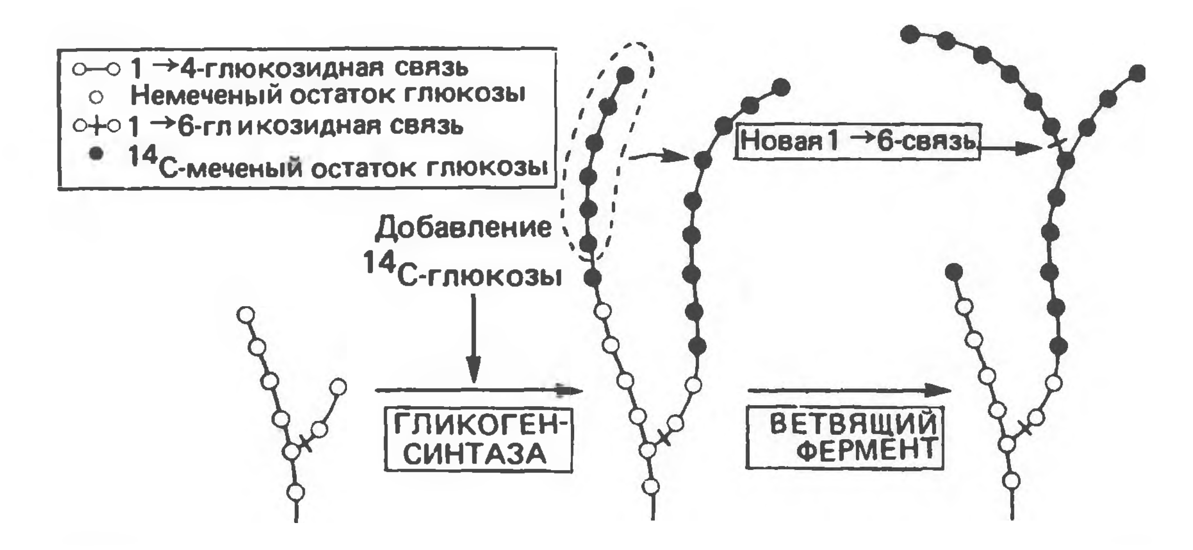


Рис. 19.3. Биосинтез гликогена. Механизм ветвления установлен с использованием [^{14}C] глюкозы.

(1 → 6)-связью; таким образом образуется **точка ветвления** в молекуле. Ветви растут путем последовательного присоединения (1 → 4)-глюкозильных единиц и дальнейшего ветвления.

Действие ветвящего фермента изучалось на животных путем добавления в пищу ^{14}C-меченной глюкозы с последующим исследованием гликогена печени через определенные интервалы времени (рис. 19.3).

ГЛИКОГЕНОЛИЗ

Путь распада и расщепления в точках ветвления (см. рис. 19.1)

Стадией, лимитирующей скорость гликогенолиза, является реакция, катализируемая **фосфорилазой**:

$$\underset{\text{Гликоген}}{(C_6)_n} + P_i \rightarrow \underset{\text{Гликоген}}{(C_6)_{n-1}} + \text{Глюкозо-1-фосфат}$$

Фермент специфично катализирует фосфоролитическое расщепление (фосфоролиз) (1 → 4)-связей гликогена, продуктом является глюкозо-1-фосфат. Остатки глюкозы отщепляются от дальних концов молекулы гликогена до тех пор, пока на ветвях, идущих от точки ветвления ([1 → 6]-связи), не останется примерно по 4 остатка глюкозы (рис. 19.4). Другой фермент **(α-[1 → 4] → α-[1 → 4]-глюкантрансфераза)** переносит трисахаридный фрагмент с одной цепи на другую, экспонируя (1 → 6)-пункт ветвления. **Гидролитическое** расщепление (1 → 6)-связей осуществляет **деветвящий (дебранчинг) фермент (амило-[1 → 6]-глюкозидаза)**; по-видимому, это второй вид активности глюкантрансферазы[1]. После удаления ветви на цепь гликогена снова действует фосфорилаза. Совместное действие фосфорилазы и других рассмотренных выше ферментов приводит к полному распаду гликогена. Реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой, обратима; поэтому из глюкозо-1-фосфата может образовываться глюкозо-6-фосфат. В **печени** и **почках** (но не в мышцах) имеется специфический фермент **глюкозо-6-фосфатаза,** отщепляющий фосфат от глюкозо-6-фосфата. Образовавшаяся глюкоза диффундирует из клеток в кровь. Это заключительная стадия гликогенолиза в печени, приводящего к повышению содержания глюкозы в крови.

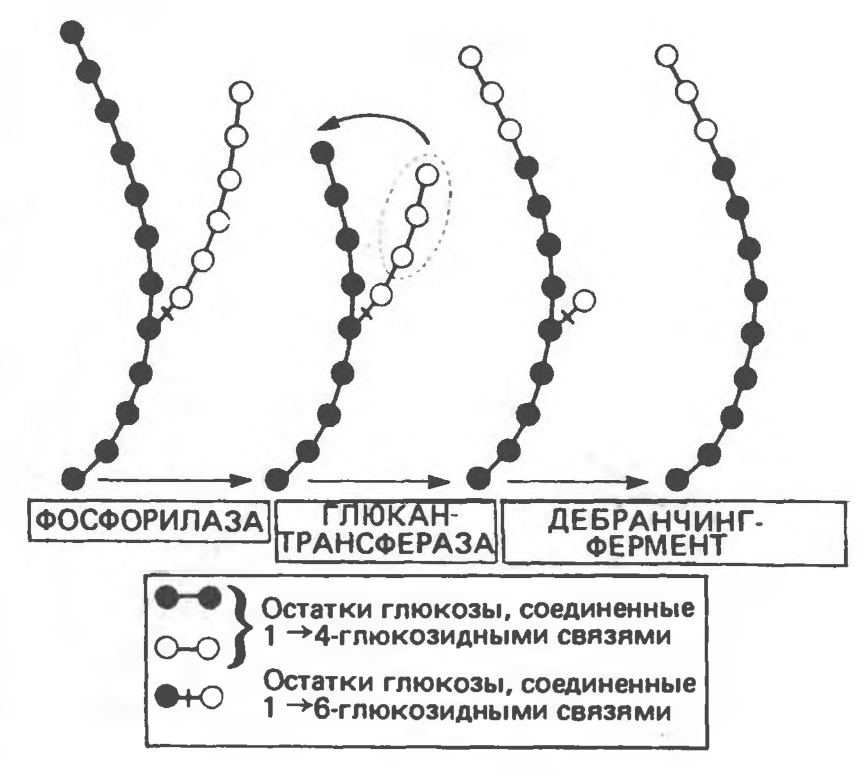


Рис. 19.4. Стадии гликогенолиза.

[1] **Поскольку (1 → 6)-связь расщепляется гидролитическим путем, образуется 1 моль свободной глюкозы, а не 1 моль глюкозо-1-фосфата, в результате содержание глюкозы в крови может повышаться даже в отсутствие глюкозо-6-фосфатазы, как это наблюдается, например, в случае гликогеноза типа I (болезнь фон Гирке, см. ниже) после введения глюкагона или адреналина.**

МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ ГЛИКОГЕНОЛИЗА И ГЛИКОГЕНЕЗА

Главные ферменты, контролирующие метаболизм гликогена,— гликогенфосфорилаза и гликогенсинтаза — регулируются сложной серией реакций, в которых используются как аллостерические механизмы (см. с. 104), так и ковалентная модификация путем фосфорилирования и дефосфорилирования фермента (см. с. 108).

Активация и инактивация фосфорилазы (рис. 19.5)

В печени фосфорилаза находится как в активной, так и в неактивной форме. В активной фосфорилазе (**фосфорилазе *a***) гидроксильная группа одного из остатков серина фосфорилирована. Под действием специфической фосфатазы (**протеинфосфатазы-1**) фермент превращается в неактивную **фосфорилазу *b*** в результате гидролитического отщепления фосфата от остатка серина. Реактивация происходит путем рефосфорилирования за счет АТР при действии специфического фермента **киназы фосфорилазы**.

Мышечная фосфорилаза иммунологически и генетически отличается от соответствующего фермента печени. Она может находиться в двух формах: в форме **фосфорилазы *a*** — фосфорилированного фермента, активного как в присутствии, так и в отсутствие АМР (ее аллостерического модулятора), и в форме **фосфорилазы *b***, дефосфорилированной и активной только в присутствии АМР. Фосфорилаза *a* является нормальной физиологически активной формой фермента. Она представляет собой димер, каждый мономер которого содержит одну молекулу пиридоксальфосфата.

Активация с участием cAMP

В мышце фосфорилаза активируется адреналином (рис. 19.5). Однако он оказывает не прямой эффект, а действует опосредованно через cAMP (3′,5′-циклоадениловую кислоту; циклический АМР) (рис. 19.6 и гл. 44). cAMP представляет собой внутриклеточный интермедиат, выступающий в роли **второго посредника** при действии ряда гормонов. Он образуется из АТР при действии фермента **аденилатциклазы**, находящейся на внутренней поверхности клеточной мембраны. Аденилатциклаза активируется (опосредованно) гормонами **адреналином** и **норадреналином** — лигандами β-адренергических рецепторов, локализованных в клеточной мембране; в печени она активируется **глюкагоном**, действующим

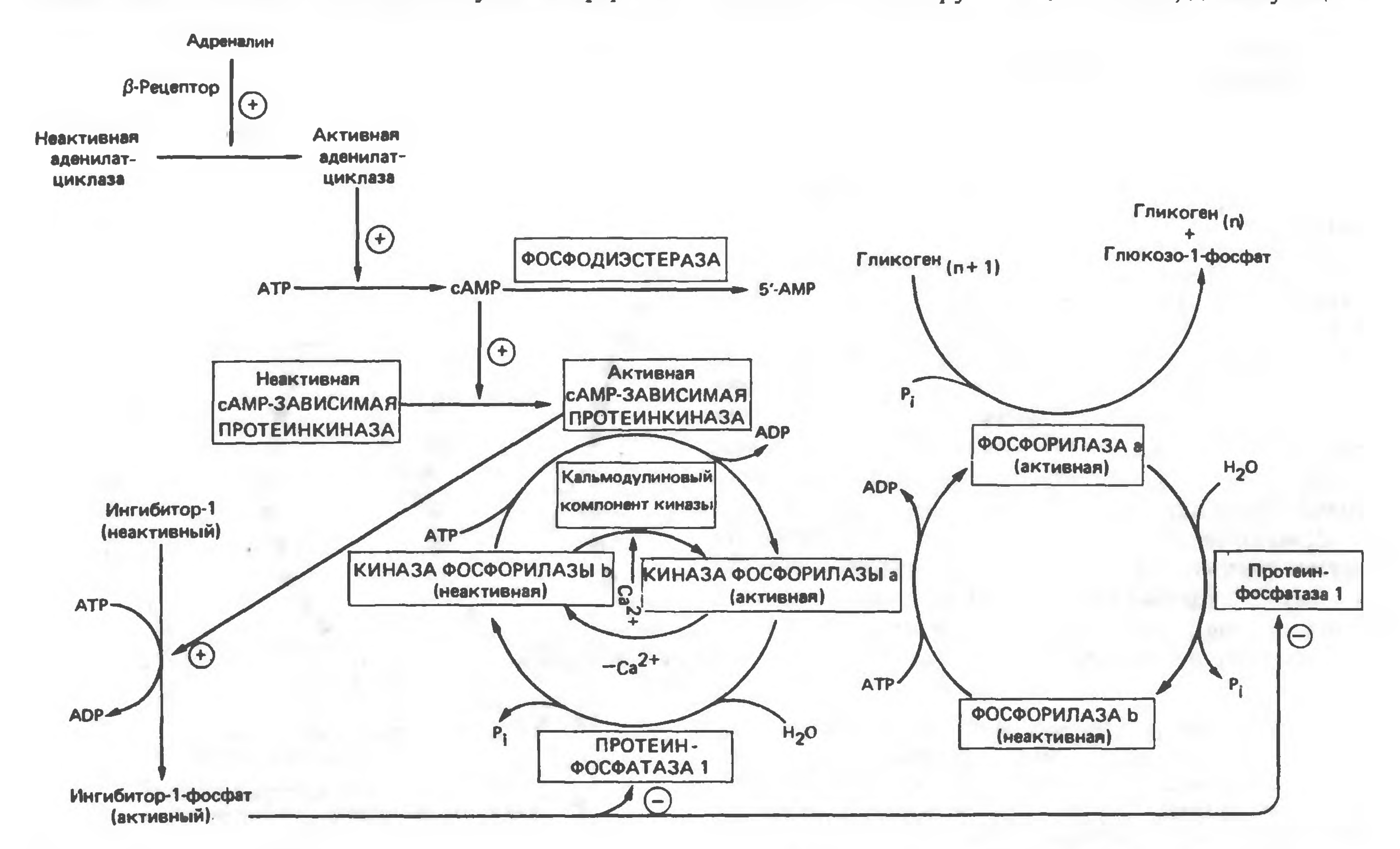


Рис. 19.5. Регуляция активности фосфорилазы в мышцах (n — число остатков глюкозы). Последовательность реакций образует каскад; это позволяет усиливать гормональный сигнал на каждой стадии.

Рис. 19.6. 3′, 5′-Адениловая кислота (циклический AMP, cAMP).

при участии специального **глюкагонового рецептора**. cAMP разрушается при действии **фосфодиэстеразы**; именно этот фермент поддерживает в норме концентрацию cAMP на низком уровне. Имеются данные о том, что инсулин повышает активность фосфодиэстеразы в печени; это приводит к понижению концентрации cAMP.

Повышение концентрации cAMP активирует фермент, обладающий весьма широкой специфичностью — **cAMP-зависимую протеинкиназу**. Эта киназа катализирует фосфорилирование при участии ATP неактивной **киназы фосфорилазы** с образованием активной **киназы фосфорилазы**, которая в свою очередь, путем фосфорилирования, активирует фосфорилазу *b*, переходящую в фосфорилазу *a* (рис. 19.5).

Неактивная cAMP-зависимая протеинкиназа состоит из двух пар субъединиц; в каждую пару входят регуляторная субъединица (R), способная связывать две молекулы cAMP, и каталитическая субъединица (C), структура которой включает активный центр. Связывание cAMP с комплексом R_2C_2 вызывает диссоциацию последнего, приводящую к освобождению активных C-мономеров (см. гл. 44):

$$R_2C_2 + 4cAMP \longleftrightarrow 2C + 2(R{-}cAMP_2).$$

Неактивный фермент — Активный фермент

Активация ионами Ca^{2+} и синхронизация с мышечным сокращением

Сразу после начала сокращения мышцы гликогенолиз возрастает в несколько сотен раз. Процесс включает быструю активацию фосфорилазы благодаря активации киназы фосфорилазы ионами Ca^{2+} — тем же сигналом, который инициирует сокращение. Мышечная киназа фосфорилазы состоит из субъединиц четырех типов: α, β, γ и δ. Ее структура — $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. Субъединицы α и β содержат остатки серина, фосфорилируемые cAMP-зависимой протеинкиназой. β-Субъединица связывает четыре иона Ca^{2+}, она идентична Ca^{2+}-связывающему белку **кальмодулину**. Связывание ионов Ca^{2+} активирует каталитический центр γ-субъединицы, хотя молекула остается в дефосфорилированной *b*-конфигурации. В то же время полную активность фосфорилированная *a*-форма приобретает только в присутствии ионов Ca^{2+}. Важно отметить, что кальмодулин имеет структурное сходство с мышечным Ca^{2+}-связывающим белком тропонином C (TpC). С киназой фосфорилазы может взаимодействовать вторая молекула кальмодулина или TpC, вызывая дополнительную активацию фермента. Таким образом, активация мышечного сокращения и гликогенолиз осуществляются одним и тем же Ca^{2+}-связывающим белком. Кальмодулин — белок, который участвует во многих видах воздействия кальция на клетку (см. гл. 44).

Гликогенолиз в печени

Установлено, что при стимуляции гликогенолиза катехоламинами в **печени** в качестве главных посредников выступают **α_1-рецепторы**. При этом происходит **cAMP-независимая** мобилизация ионов Ca^{2+} и переход их из митохондрий в цитозоль, где они стимулируют **Ca^{2+}/кальмодулинчувствительную киназу фосфорилазы**. Фосфорилаза скелетных мышц в отличие от фосфорилазы печени не активируется глюкагоном. Отметим, что фосфорилаза сердечной мышцы активируется этим гормоном. Другим важным отличием является ингибирование печеночной протеинфосфатазы-1 активной формой фосфорилазы.

Инактивация фосфорилазы

Фосфорилаза *a* и киназа фосфорилазы *a* дефосфорилируются и инактивируются **протеинфосфатазой-1**. Ингибитором протеинфосфатазы-1 является белок, который называют **ингибитором-1**; последний становится активным только после фосфорилирования cAMP-зависимой протеинкиназой. Таким образом, cAMP контролирует как активацию, так и инактивацию фосфорилазы (рис. 19.5).

Активация и инактивация гликогенсинтазы (рис. 19.7)

Подобно фосфорилазе, гликогенсинтаза может находиться либо в фосфорилированном, либо в нефосфорилированном состоянии. Однако в отличие от фосфорилазы в этом случае активна дефосфорилированная форма (**гликогенсинтаза *a***), которая может быть инактивирована с образованием **гликогенсинтазы *b*** путем фосфорилирования семи остатков

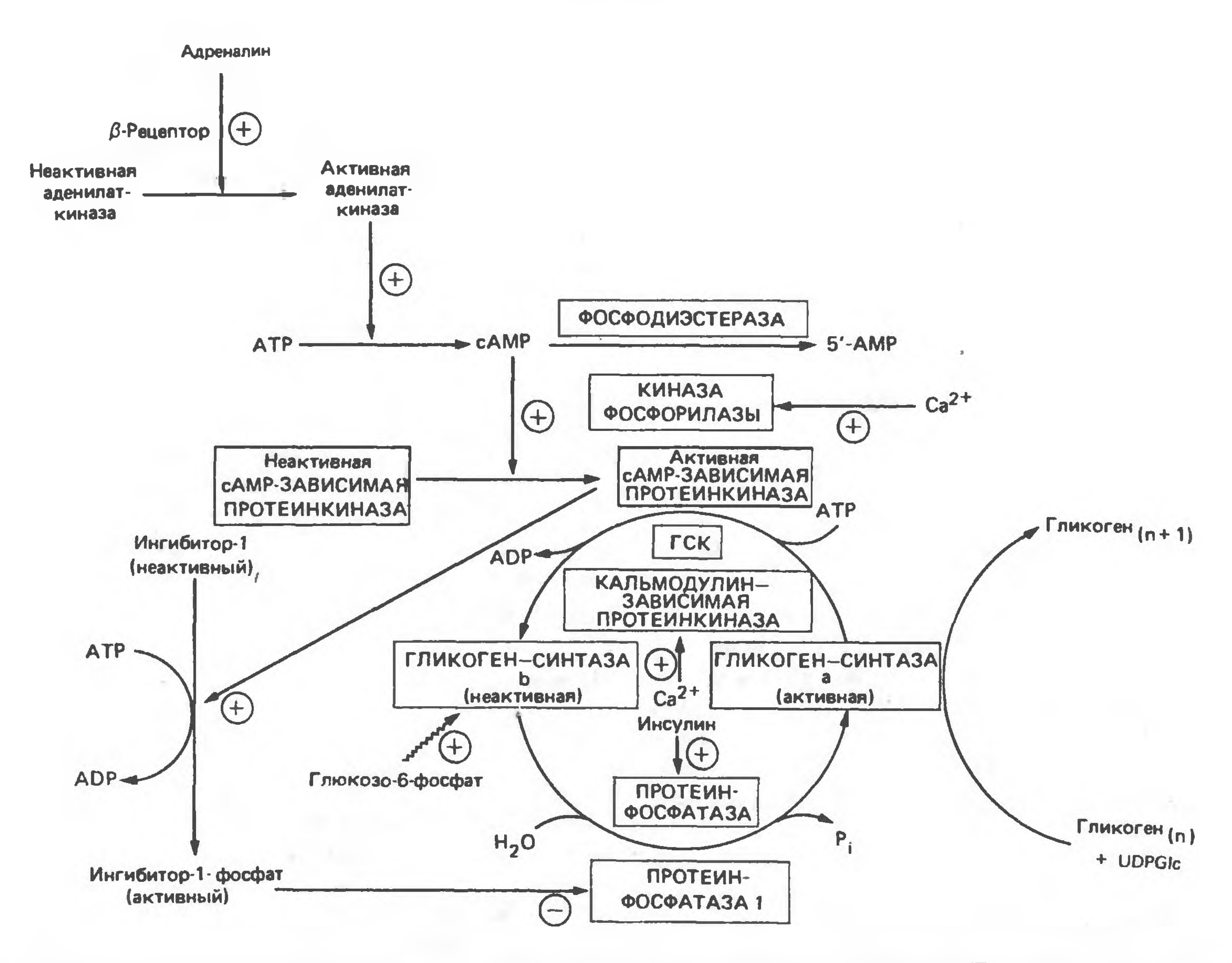


Рис. 19.7. Регуляция активности гликогенсинтазы в мышцах (n — число остатков глюкозы). Последовательность реакций образует каскад, который позволяет усиливать сигнал на каждой стадии; наномольные количества гормона могут вызывать значительные изменения концентрации гликогена. ГСК — киназы гликогенсинтазы-3, -4 и -5. Волнистой стрелкой показана аллостерическая активация.

серина, осуществляемого не менее чем пятью различными протеинкиназами. Все семь мест фосфорилирования находятся на каждой из четырех идентичных субъединиц. Две из протеинкиназ являются Ca^{2+}/кальмодулинзависимыми. Одна из них — это киназа фосфорилазы, другая киназа является cAMP-зависимой протеинкиназой; **именно эта протеинкиназа обеспечивает реализацию опосредованных cAMP гормональных воздействий, синхронно ингибирующих синтез гликогена и активацию гликогенолиза**. Оставшиеся киназы известны как киназы гликогенсинтазы-3, -4 и -5.

Глюкозо-6-фосфат является аллостерическим активатором гликогенсинтазы ***b***, вызывая снижение K_M для UDP-глюкозы и обеспечивая тем самым возможность синтеза гликогена фосфорилированной формой фермента. Гликоген оказывает ингибирующее действие на собственный синтез; **инсулин** стимулирует синтез гликогена в мышце, способствуя дефосфорилированию и активации гликогенсинтазы ***b***. В норме дефосфорилирование гликогенсинтазы ***b*** осуществляется протеинфосфатазой-1, находящейся под контролем cAMP-зависимой протеинкиназы (рис. 19.7).

Другие аспекты регуляции метаболизма гликогена будут обсуждаться на с. 219.

БОЛЕЗНИ, СВЯЗАННЫЕ С НАКОПЛЕНИЕМ ГЛИКОГЕНА (ГЛИКОГЕНОЗЫ)

Термин «гликогеноз» является общим для группы наследственных заболеваний, характеризующихся отложением в тканях либо ненормально больших количеств гликогена, либо необычных его видов.

При **гликогенозе I типа (болезнь Гирке)** клетки печени и извитых почечных канальцев заполнены гликогеном, однако эти запасы оказываются недоступными: об этом свидетельствует гипогликемия, а также отсутствие повышения уровня глюкозы в крови в ответ на адреналин и глюкагон. Обычно у этих больных развиваются кетоз и гиперлипемия, что вообще характерно для состояния организма при недостатке углеводов. В печени, почках и тканях кишеч-

ника **активность глюкозо-6-фосфатазы либо крайне низка, либо вообще отсутствует**.

Гликогеноз II типа (болезнь Помпа) ведет к фатальным последствиям и характеризуется отсутствием лизосомальной α-(1 → 4)- и (1 → 6)-глюкозидазы (кислой мальтазы), функцией которой является деградация гликогена, предотвращающая его накопление в лизосомах.

Гликогеноз III типа (лимитдекстриноз; болезнь Форбса или болезнь Кори) характеризуется отсутствием деветвящего фермента; в результате накапливается характерный разветвленный полисахарид (остаточный декстрин).

Гликогеноз IV типа (амилопектиноз; болезнь Андерсен) характеризуется отсутствием ветвящего фермента, в результате чего накапливается полисахарид, содержащий незначительное число ветвей. Обычно летальный исход наступает из-за сердечной или печеночной недостаточности в первый год жизни.

Отсутствие мышечной фосфорилазы (миофосфорилазы) является причиной **гликогеноза V типа (миофсофорилазная недостаточность; синдром Мак-Ардля)**. У больных наблюдается пониженная выносливость к физическим нагрузкам. Хотя в их скелетных мышцах имеется аномально высокое содержание гликогена (2,5—4,1%), в крови после выполнения физической работы почти или вообще не обнаруживается лактат.

Описаны гликогенозы, связанные с недостаточностью фосфорилазы в печени (**гликогеноз VI типа**), недостаточностью фосфофруктокиназы в мышцах и эритроцитах (**гликогенез VII типа; болезнь Таруи**), а также гликогеноз, обусловленный недостаточностью киназы фосфорилазы. Сообщалось также о случаях недостаточности **аденилаткиназы и сАМР-зависимой протеинкиназы**.

ЛИТЕРАТУРА

Brown D. H., Brown B. I. Some inborn errors of carbohydrate metabolism, Page 391. In: MTP International Review of Science, Vol. 5, Whelan W. J. (ed.), Butterworth, 1975.

Cohen P. Control of Enzyme Activity, 2nd ed., Chapman and Hall, 1983.

Cohen P. The role protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity, Eur. J. Biochem., 1985, **151**, 439.

Exton J. H. Molecular mechanism involved in α-adrenergic responses, Mol. Cell. Endocrinol., 1981, **23**, 233.

Hers H. G. The control of glycogen metabolism in the liver, Annu. Rev. Biochem., 1976, **45**, 167.

Randle P. J., Steiner D. F., Whelan W. J. (eds), Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, Vol. 3, Academic Press, 1981.

Sperling O., de Vries A. (eds), Inborn Errors of Metabolism in Man, Karger, 1978.

Stanbury J. B. et al. (eds), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., McGraw-Hill, 1983.

Глава 20

Глюконеогенез и пентозофосфатный путь

Питер Мейес

ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

ВВЕДЕНИЕ

Глюконеогенез включает все механизмы и пути, обеспечивающие образование глюкозы и гликогена из неуглеводных компонентов. Главными субстратами глюконеогенеза служат глюкогенные аминокислоты, лактат, глицерол и (у жвачных) пропионат. Гликонеогенез происходит главным образом в печени и почках, поскольку именно в этих органах имеется полный набор необходимых ферментов.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Глюконеогенез обеспечивает потребности организма в глюкозе в тех случаях, когда диета содержит недостаточное количество углеводов. Постоянное поступление глюкозы в качестве источника энергии особенно необходимо для нервной системы и эритроцитов. При понижении концентрации глюкозы в крови ниже определенного критического уровня нарушается функционирование мозга; при тяжелой гипогликемии возникает коматозное состояние и может наступить летальный исход. Глюкоза необходима также для жировой ткани как источник глицерола, входящего в состав глицеридов; она играет, вероятно, существенную роль в поддержании эффективных концентраций интермедиатов цикла лимонной кислоты во многих тканях. Из этого следует, что даже в условиях, когда бóльшая часть потребностей организма в калориях обеспечивается за счет жира, **всегда сохраняется определенная потребность в глюкозе**. Кроме того, глюкоза служит единственным видом топлива для работы скелетной мышцы в анаэробных условиях. Она является предшественником молочного сахара (лактозы) в молочных железах и активно потребляется плодом в период развития. Следует отметить также, что механизм глюконеогенеза используется для удаления из крови продуктов тканевого метаболизма, например лактата, образующегося в мышцах и эритроцитах, глицерола, непрерывно образующегося в жировой ткани. Пропионат — главная глюкогенная жирная кислота, образующаяся в процессе переваривания углеводов жвачными животными, является главным субстратом глюконеогенеза у этих животных.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗЕ (рис. 20.1)

Эти пути являются модификациями путей гликолиза и цикла лимонной кислоты. Кребс отметил, что простому обращению гликолиза препятствуют энергетические барьеры на ряде стадий: 1) между пируватом и фосфоенолпируватом, 2) между фруктозо-1,6-бисфосфатом и фруктозо-6-фосфатом, 3) между глюкозо-6-фосфатом и глюкозой, а также 4) между глюкозо-1-фосфатом и гликогеном. Эти барьеры обходятся с помощью специальных реакций.

1) В митохондриях имеется фермент **пируваткарбоксилаза**, который при участии АТР, биотина (витамина группы В) и CO_2 превращает пируват в оксалоацетат. Функция биотина заключается в присоединении CO_2 (из бикарбоната) к ферменту, далее CO_2 переносится на пируват (см. ниже). Во внемитохондриальной среде клетки имеется второй фермент — **фосфоенолпируваткарбоксикиназа**, который катализирует превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват. Для этой реакции требуется высокоэнергетический фосфат в форме GTP или ITP; в результате реакции освобождается CO_2. Таким образом, с помощью этих двух ферментов и лактатдегидрогеназы лактат может превращаться в фосфоенолпируват.

Существенное препятствие, однако, заключается в том, что выход оксалоацетата из митохондрии весьма затруднен. Оно преодолевается следующим образом: оксалоацетат превращается в соединение, легко диффундирующее из митохондрии во внемитохондриальный компартмент клетки, где это соеди-

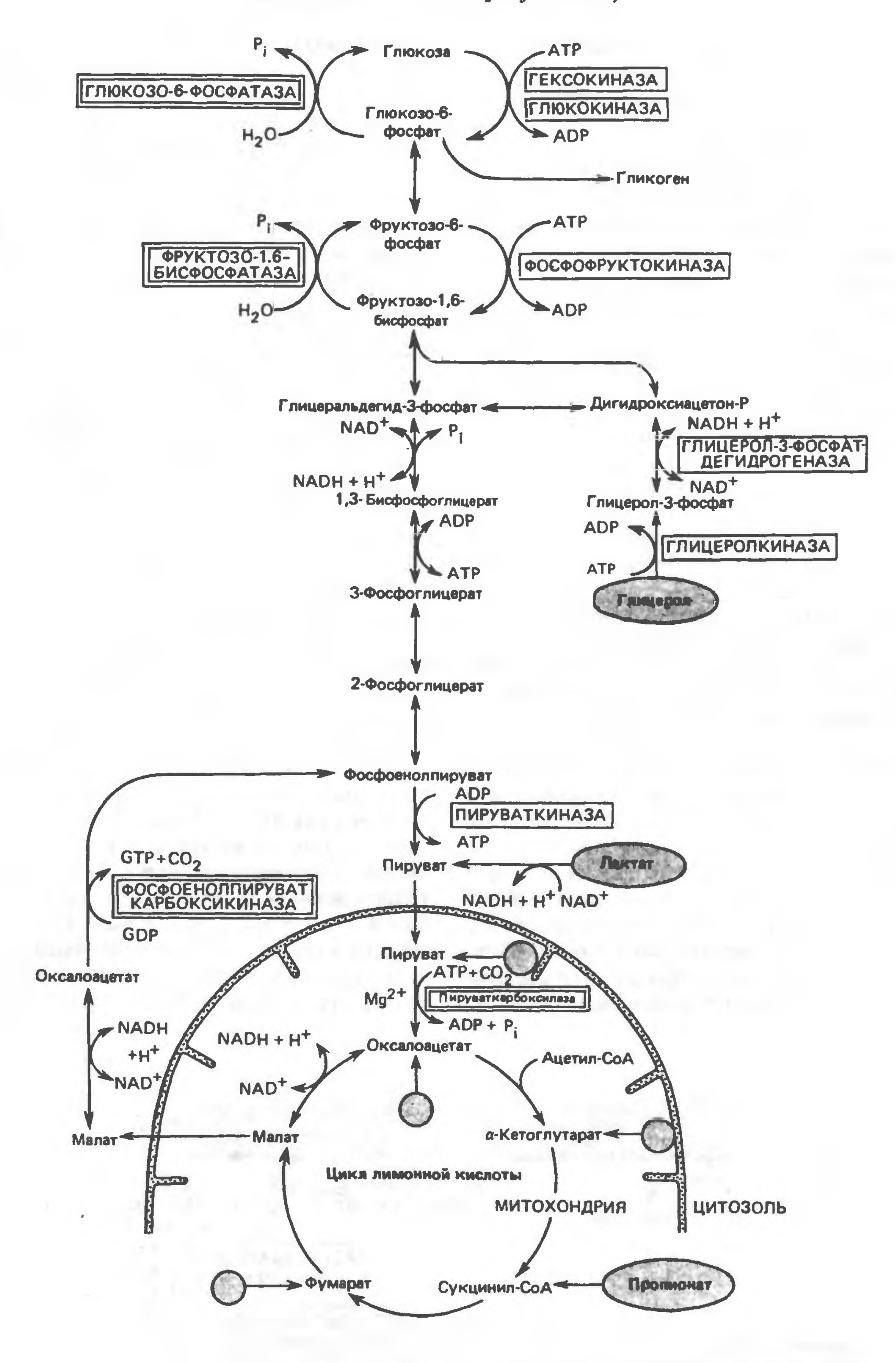


Рис. 20.1. Главные пути глюконеогенеза в печени. Кружок со стрелкой показывает места вступления в цикл глюкогенных аминокислот после переаминирования (см. также рис. 17.7). Названия ключевых ферментов глюконеогенеза заключены в двойной прямоугольник. АТР, необходимый для поддержания глюконеогенеза, генерируется в ходе окисления ацетил-СоА, который в свою очередь образуется из длинноцепочечных жирных кислот или из лактата (через пируват, при действии пируватдегидрогеназы). У жвачных животных важным источником ацетил-СоА служит пропионат.

нение снова превращается в оксалоацетат. Таким соединением служит малат; его образование из оксалоацетата внутри митохондрий и превращение обратно в оксалоацетат вне митохондрий катализируются малатдегидрогеназой.

2) Превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат, необходимое для обращения гликолиза на рассматриваемой стадии, катализируется специфическим ферментом **фруктозо-1,6-бисфосфатазой**. Это — ключевой фермент в том смысле, что именно его присутствием определяется, способна ли ткань ресинтезировать гликоген из пирувата и триозофосфатов. Этот фермент имеется в печени и почках, он был также обнаружен в поперечнополосатых мышцах. Считают, что в сердечной мышце и гладких мышцах он отсутствует.

3) Превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозу катализируется другой специфической фосфатазой — **глюкозо-6-фосфатазой**. Она присутствует в печени и почках, но отсутствует в мышцах и жировой ткани. Наличие этого фермента позволяет ткани поставлять глюкозу в кровь.

4) Распад гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата осуществляется фосфорилазой. Синтез гликогена идет по совершенно другому пути, через образование уридиндифосфатглюкозы, и катализируется **гликогенсинтазой** (см. рис. 19.1).

Взаимоотношения между этими ключевыми ферментами глюконеогенеза и гликолизом показаны на рис. 20.1. После переаминирования или дезаминирования глюкогенные аминокислоты образуют либо пируват, либо интермедиаты цикла лимонной кислоты. Поэтому описанные выше реакции могут обеспечить превращение как глюкогенных аминокислот, так и лактата в глюкозу и гликоген. Так, например, лактат превращается в пируват, который далее поступает в митохондрии, где превращается в оксалоацетат, а затем по рассмотренному выше пути — в глюкозу.

Пропионат, главный источник глюкозы у жвачных животных, вступает на путь глюконеогенеза через цикл лимонной кислоты после превращения в сукцинил-CoA. Сначала пропионат активируется при взаимодействии с ATP и CoA с помощью соответствующей **ацил-CoA-синтазы**. Продукт этой реакции, пропионил-CoA, присоединяет CO_2 в реакции, катализируемой **пропионил-CoA-карбоксилазой** и превращается в D-метилмалонил-CoA (рис. 20.2). Эта реакция аналогична реакции присоединения CO_2 к ацетил-CoA, катализируемой ацетил-CoA-карбоксилазой (гл. 23), в том отношении, что продуктом ее является малонильное производное и в качестве кофермента требуется **биотин**. D-Метилмалонил-CoA сначала превращается под действием **метилмалонил-CoA-рацемазы** в свой стереоизомер L-метилмалонил-CoA, а затем последний изомеризуется в сукцинил-CoA при участии **метилмалонил-CoA-изомеразы**, использующей в качестве кофермента **витамин** $\mathbf{B_{12}}$. Недостаток витамина B_{12} в организме человека и животных приводит к экскреции больших количеств метилмалоната (**метилмалоновая ацидурия**).

Хотя превращение в сукцинат является главным путем метаболизма пропионата, последний может быть также использован в качестве исходной молекулы для синтеза в жировой ткани и молочной железе жирных кислот с нечетным числом атомов углерода; $\mathbf{C_{15}}$- **и** $\mathbf{C_{17}}$-жирные кислоты обнаруживаются главным образом в липидах жвачных животных.

Глицерол является продуктом метаболизма жировой ткани; утилизировать его способны только те ткани, в которых имеется активирующий фермент **глицеролкиназа**. Этот фермент (ATP-зависимый) обнаружен в печени, почках и ряде других тканей. Глицеролкиназа катализирует превращение глицерола в глицерол-3-фосфат. Этот путь выходит на триозофосфатные стадии гликолиза, поскольку глицерол-

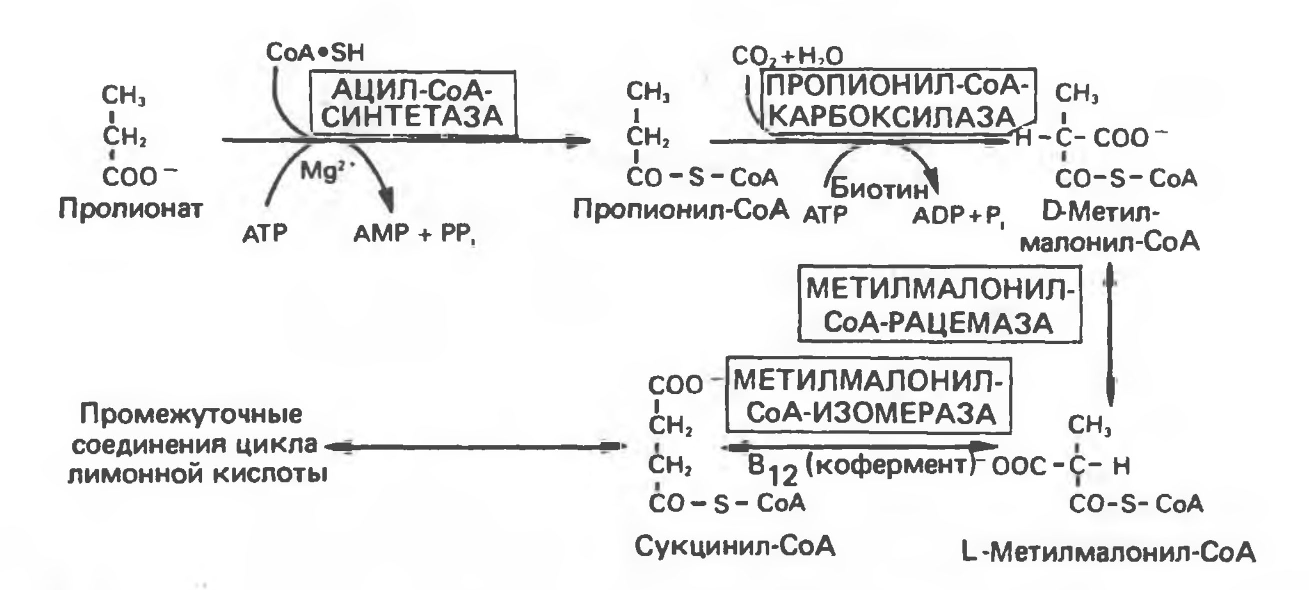


Рис. 20.2. Метаболизм пропионата.

3-фосфат может быть окислен NAD^+ до дигидроксиацетонфосфата в присутствии **глицерол-3-фосфатдегидрогеназы**. Таким образом, печень и почки способны превращать глицерол в глюкозу, поступающую в кровь; при этом наряду с упомянутыми выше ферментами используются ряд ферментов гликолиза и специфические ферменты глюконеогенеза — фруктозо-1,6-бисфосфатаза и глюкозо-6-фосфатаза (рис. 20.1).

Биотин

Биотин — один из водорастворимых витаминов группы В. Он является производным имидазола и широко распространен в натуральных пищевых продуктах (рис. 20.3). Значительную долю потребностей человека в биотине, вероятно, обеспечивают **бактерии кишечника.**

Биотин функционирует как компонент специфических мультисубъединичных ферментов (табл. 20.1), катализирующих реакции карбоксилирования. Он связан с апоферментом амидной связью, образуемой с ε-аминогруппой остатка лизина.

На первой стадии реакции, катализируемой **пируваткарбоксилазой**, карбоксилатный ион связывается с атомом N^1 биотина, в результате образуется активированный интермедиат **карбоксибиотин-фермент** (рис. 20.4). Для протекания этой стадии необходимы HCO_3^-, ATP, Mg^{2+} и ацетил-СоА (последний в качестве аллостерического эффектора). Далее активированная карбоксильная группа переносится с интермедиата (карбоксибиотин-фермента) на пируват, при этом образуются оксалоацетат и биотинсодержащий холофермент. Длинная гибкая «ручка» (цепочка атомов) между биотином и ферментом, по-видимому, позволяет простетической группе (биотину) перемещаться от одного активного центра мультисубъединичного фермента к другому (например, с фосфокарбонатобразующего центра на пируватсвязывающий центр).

Для всех апоферментов карбоксилаз имеется, по-видимому, единственный фермент, катализирующий присоединение биотина к специфическому остатку лизина. Этот фермент был назван синтетазой холокарбоксилазы. При отсутствии фермента субстраты биотинзависимых карбоксилаз накапливаются и могут быть обнаружены в моче. К числу этих метаболитов относятся лактат, β-метилкротонат, β-гидроксиизовалерат и β-гидроксипропионат. У детей с недостаточностью этого фермента развивается дерматит, замедлен рост, наблюдаются алопеция, расстройство мышечной деятельности и, в некоторых случаях, заболевания, связанные с ослаблением функции иммунной системы.

O
‖
C
H–N N–H
H–C —— C–H
H_2C S CH–$(CH_2)_4$COOH

Рис. 20.3. Биотин.

Таблица 20.1. Биотинзависимые ферменты животных

Фермент	Функция
Пируваткарбоксилаза	Катализирует первую реакцию пути, ведущего к превращению трехуглеродных предшественников в глюкозу (глюконеогенез) Образование оксалоацетата, участвующего в цикле лимонной кислоты
Ацетил-СоА-карбоксилаза	Катализирует образование малонил-СоА, поставляющего ацетатные единицы для синтеза жирных кислот
Пропионил-СоА-карбоксилаза	Превращение пропионата в сукцинат, который далее может вступать в цикл лимонной кислоты
β-Метилкротонил-СоА-карбоксилаза	Катаболизм лейцина и некоторых изопреноидных соединений

ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ИЛИ ГЕКСОЗОМОНОФОСФАТНЫЙ ШУНТ

ВВЕДЕНИЕ

Пентозофосфатный путь является альтернативным путем окисления глюкозы. Он включает несколько циклов, в результате функционирования которых из трех молекул глюкозо-6-фосфата образуются три молекулы CO_2 и три молекулы пентоз. Последние используются для регенерации двух молекул глюкозо-6-фосфата и одной молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Поскольку из двух молекул глицеральдегид-3-фосфата можно регенерировать молекулу глюкозо-6-фосфата, глюкоза может быть полностью окислена при превращении по пентозофосфатному пути:

3 Глюкозо-6-фосфат + 6 $NADP^+$ → 3 CO_2 + 2 Глюкозо-6-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат + 6 NADPH + 6 H^+.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Пентозофосфатный цикл не приводит к синтезу ATP, он выполняет две главные функции: 1) образование NADPH для восстановительных синтезов, таких, как синтез жирных кислот и стероидов; 2) обеспечение рибозой синтеза нуклеотидов и нуклеино-

Рис. 20.4. Образование пируваткарбоксилазного комплекса CO_2-биотин-фермент и катализируемое им превращение пирувата в оксалоацетат.

вых кислот. Недостаточность ряда ферментов пентозофосфатного пути является причиной гемолиза эритроцитов. Например, одна из форм гемолитической анемии обусловлена недостаточностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. На земле живет около 100 миллионов людей с генетически обусловленным пониженным уровнем глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; этот фермент представлен изоформами с различной активностью. Эти формы могут быть выявлены с помощью электрофореза или других методов.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕАКЦИЙ

Ферменты пентозофосфатного пути локализованы во **внемитохондриальном** пространстве клетки — в цитозоле. Как и в процессе гликолиза, окисление осуществляется путем дегидрогенирования, однако акцептором водорода в этом случае служит не NAD, а NADP.

Последовательность реакций пути можно разделить на две фазы: окислительную и неокислительную. В реакциях первой фазы глюкозо-6-фосфат дегидрогенируется и декарбоксилируется с образованием рибулозо-5-фосфата. В ходе второй фазы рибулозо-5-фосфат превращается снова в глюкозо-6-фосфат в результате серии реакций, в которых главную роль играют два фермента: **транскетолаза и трансальдолаза** (рис. 20.5).

Окислительная фаза

Дегидрогенирование глюкозо-6-фосфата катализируется NADP-зависимым ферментом **глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой,** при этом образуется 6-фосфоглюконолактон. Гидролиз 6-фосфоглюконолактона, катализируемый **глюконолактонгидролазой,** приводит к образованию 6-фосфоглюконата. Вторая окислительная стадия катализируется **6-фосфоглюконатдегидрогеназой,** которая также является $NADP^+$-зависимым ферментом. Далее происходит декарбоксилирование; в результате образуется кетопентоза — рибулозо-5-фосфат. Реакция, вероятно, протекает в две стадии с промежуточным образованием 3-кето-6-фосфоглюконата.

Неокислительная фаза

Образовавшийся рибулозо-5-фосфат служит субстратом для двух различных ферментов. **Рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза** изменяет конфигурацию молекулы у атома углерода 3: образуется эпимер — ксилулозо-5-фосфат, т. е. другая кетопентоза. **Рибозо-5-фосфаткетоизомераза** превращает рибулозо-5-фосфат в соответствующую альдопентозу — рибозо-5-фосфат.

Транскетолаза переносит двухуглеродную группу, включающую 1-й и 2-й атомы углерода кетозы, на альдегидный углерод альдозного сахара. Происходит, следовательно, превращение кетосахара в альдозу, содержащую на два атома углерода меньше, и одновременное превращение альдосахара в кетозу, содержащую на два атома углерода больше. Коферментом реакции является тиаминидифосфат (в его состав входит **тиамин** — витамин группы В), для ее протекания необходимы ионы Mg^{2+}. Переносимая двухуглеродная группа является, вероятно, гликоальдегидом, связанным с тиаминдифосфатом, т. е. «активным гликольальдегидом». Транскетолаза катализирует перенос двухуглеродной группы с ксилулозо-5-фосфата на рибозо-5-фосфат с образованием

семиуглеродной кетозы седогептулозо-7-фосфата и альдозы глицеральдегид-3-фосфата. Эти два продукта далее вступают в следующую реакцию, называемую трансальдолазной. **Трансальдолаза** осуществляет перенос трехуглеродного фрагмента, «активного дигидроксиацетона» (атомы углерода 1—3), с кетозы седогептулозо-7-фосфата на альдозу глицеральдегид-3-фосфат; в результате образуются кетоза фруктозо-6-фосфат и четырехуглеродная альдоза эритрозо-4-фосфат.

Следующая реакция снова катализируется **транскетолазой**. В этой реакции ксилулозо-5-фосфат служит донором «активного гликоальдегида». Роль акцептора выполняет образовавшийся ранее эритрозо-4-фосфат. Продуктами этой реакции являются фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат.

Полное окисление глюкозы до молекулы CO_2 по пентозофосфатному пути возможно лишь в том случае, если в ткани присутствуют ферменты, превращающие глицеральдегид-3-фосфат в глюкозо-

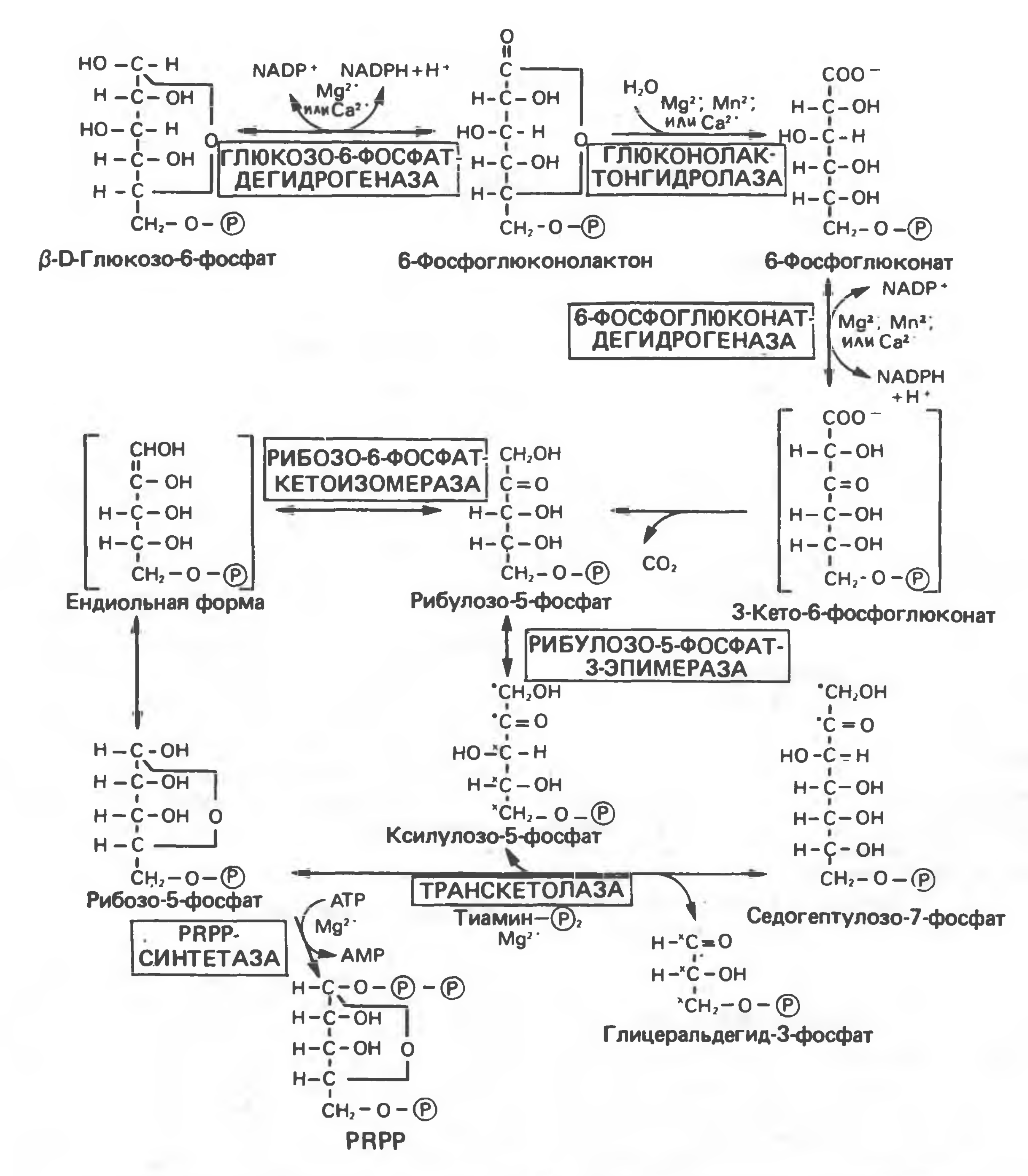


Рис. 20.5. Пентозофосфатный путь. Ⓟ — ($-PO_3^{2-}$); PRPP — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат.

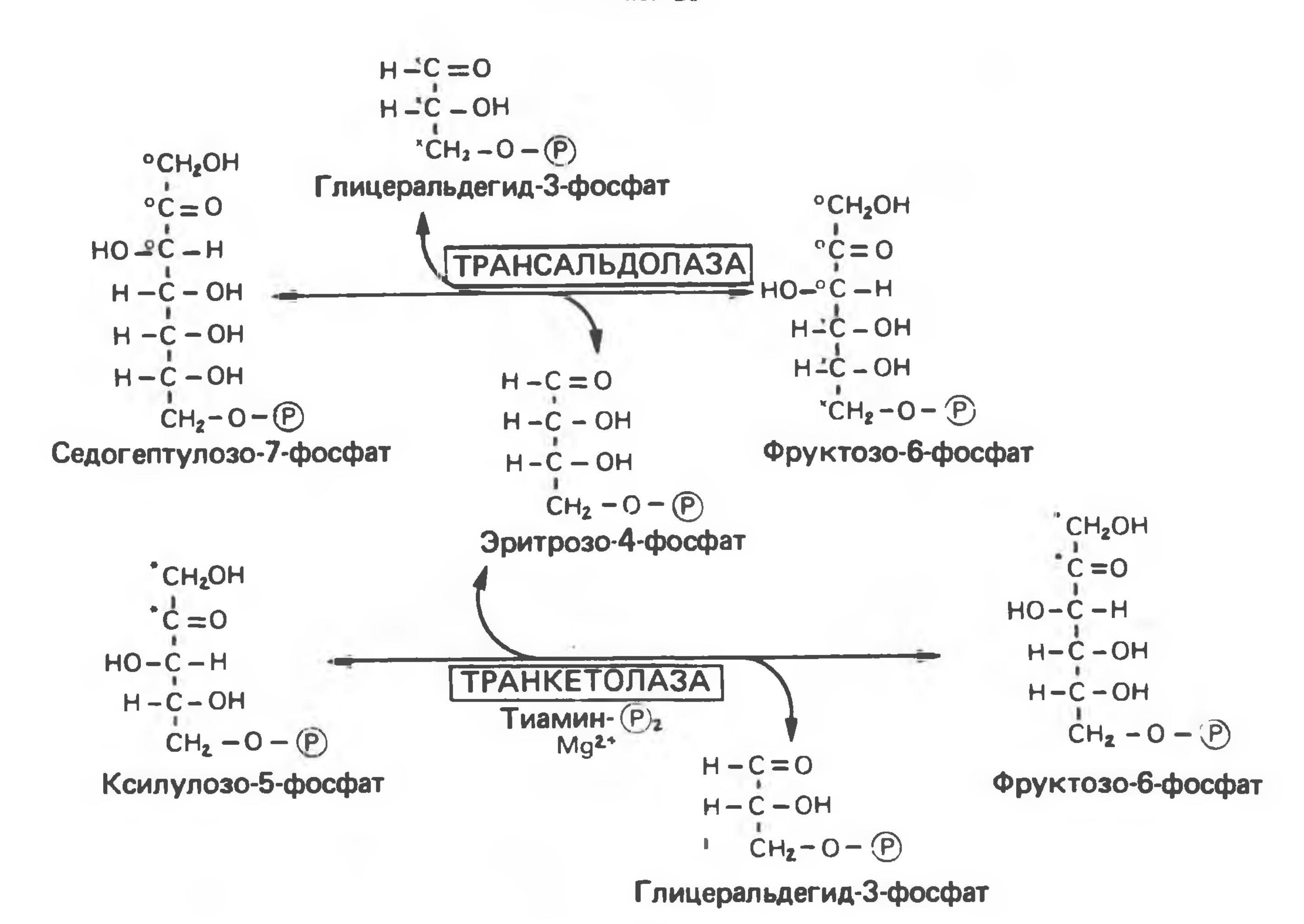


Рис. 20.5. (продолжение). Пентозофосфатный путь.

6-фосфат. В их число входят ферменты гликолитического пути, катализирующие протекание реакций в обратном направлении, а также фермент глюконеогенеза **фруктозо-1,6-бисфосфатаза**. Весь метаболический путь представлен на рис. 20.6.

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ

Сравнение с гликолизом

Пентозофосфатный путь существенно отличается от гликолиза. Окисление осуществляется на первой стадии, и в нем участвует не NAD, как в гликолизе, а NADP; одним из продуктов пентозофосфатного пути является CO_2, который в реакциях гликолиза не образуется. Наконец, пентозофосфатный путь не генерирует ATP.

Образование восстановительных эквивалентов

Значение метаболического пути для различных тканей можно оценить по его активности. Пентозофосфатный путь активно протекает в печени, жировой ткани, коре надпочечников, щитовидной железе, эритроцитах, семенниках и в молочных железах в период лактации; он неактивен в нелактирующей молочной железе и малоактивен в скелетных мышцах. Все ткани, в которых активность данного пути высока, используют в реакциях восстановительного синтеза NADPH, например в реакциях синтеза жирных кислот, стероидов, аминокислот (с участием глутаматдегидрогеназы) или восстановленного глутатиона в эритроцитах. Вероятно, в условиях активного липогенеза или при наличии любой системы, утилизирующей NADPH, возрастает активная деградация глюкозы по пентозофосфатному пути в связи с увеличением отношения NADP : NADPH. В условиях, которые возникают после приема пищи, может индуцироваться синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы.

Образование рибозы

Пентозофосфатный путь поставляет рибозу для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот (рис. 20.5). Источником рибозы является интермедиат рибозо-5-фосфат, который в реакции с ATP образует PRPP, используемый в биосинтезе нуклеотидов (см. гл. 35). Мышечная ткань содержит очень малые количества глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. Тем не менее скелетная мышца способна синтезировать рибозу. Вероятно, это осуществляется при обращении неокислите-

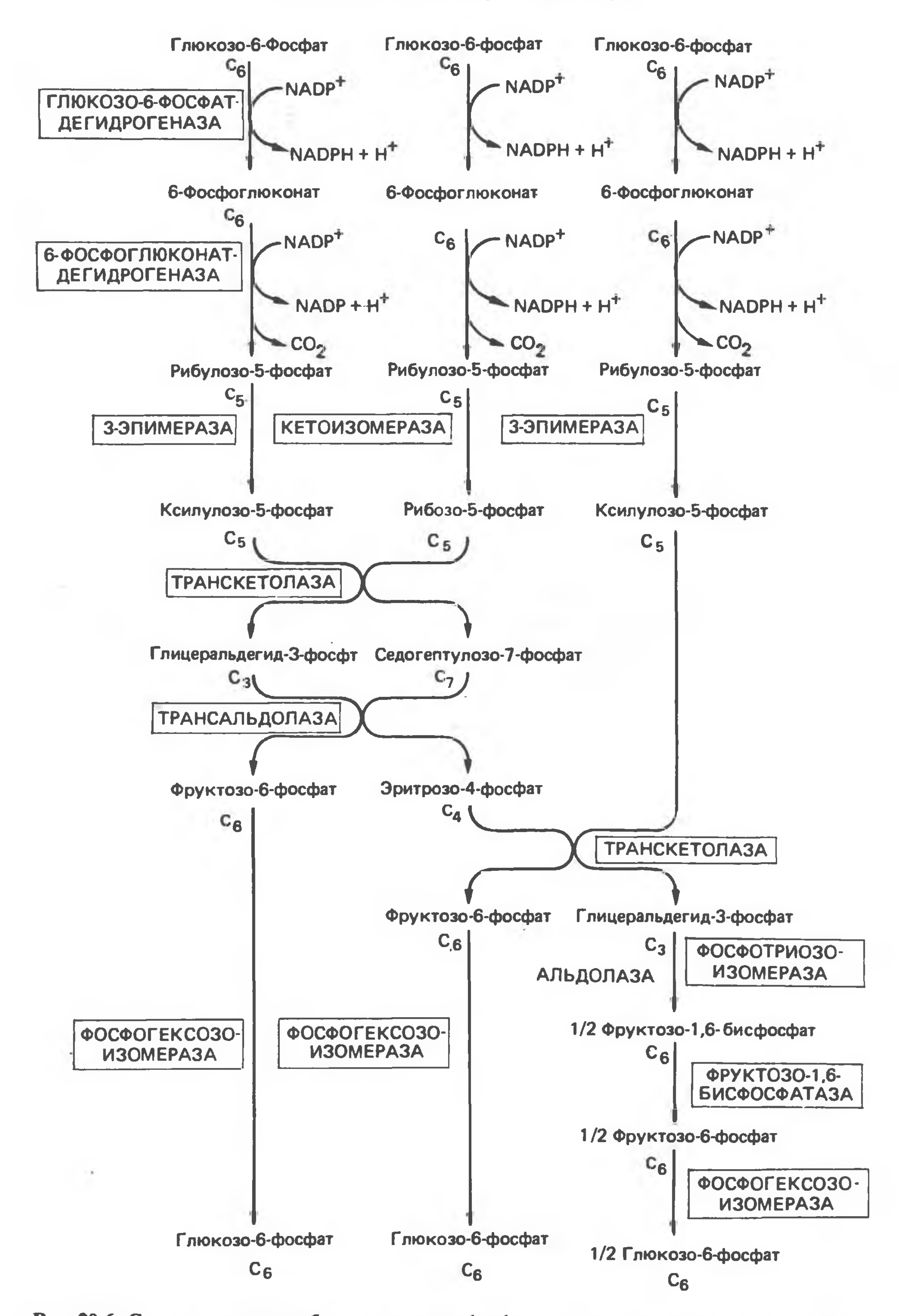


Рис. 20.6. Схема потока метаболитов пентозофосфатного пути и их связи с гликолизом.

льной фазы пентозофосфатного пути, утилизирующей фруктозо-6-фосфат. Таким образом, **синтез рибозы может осуществляться в ткани, если в ней протекает часть реакций пентозофосфатного пути.**

КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Пентозофосфатный путь в эритроцитах поставляет NADPH для восстановления окисленного глутатиона (G—S—S—G) в восстановленный глутатион (2G—SH), эта реакция катализируется **глутатионредуктазой**. Восстановленный глутатион разрушает в эритроцитах H_2O_2 в ходе реакции, катализируемой **глутатионпероксидазой**:

$$G{-}S{-}S{-}G + NADPH + H^+ \xrightarrow[\text{редуктаза}]{\text{Глутатион-}} 2G{-}SH + NADP^+$$

$$2G{-}SH + H_2O_2 \xrightarrow[\text{пероксидаза, Селен}]{\text{Глутатион-}} G{-}S{-}S{-}G + 2H_2O$$

Эта реакция имеет важное значение, так как накопление H_2O_2 может сократить время жизни эритроцитов (путем повышения скорости окисления гемоглобина в метгемоглобин). Было показано, что существует обратное соотношение между активностью **глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы** и резистентностью эритроцитов. У некоторых групп людей зарегистрирована мутация, вызывающая **недостаточность этого фермента**; следствием мутации является нарушение образования NADPH, что приводит к гемолизу эритроцитов после приема пациентами препаратов, действующих как оксиданты,— антималярийного средства примахина, аспирина, сульфаниламидов; те же последствия вызывает у некоторых людей употребление в пищу бобов (*Vicia faba*).

Определение активности **транскетолазы** в крови позволяет судить о степени недостаточности тиамина. Единственное заболевание, при котором наблюдается повышение ее активности,— пернициозная анемия.

ЛИТЕРАТУРА

Krebs H. A. Gluconeogenesis, Proc. R. Soc. Lond. [Biol.], 1964, **159**, 545.

Landau B. R., Wood H. G. The pentose cycle in animal tissues: Evidence for the classical and against the „L-type" pathway, Trends Biochem. Sci., 1983, **8**, 292.

Williams J. F. A critical examination of the evidence of the reactions of the pentose pathway in animal tissues, Trends Biochem. Sci., 1980, **5**, 315.

Wood T. The Pentose Pathway, Academic Press, 1985.

Глава 21

Метаболизм наиболее важных гексоз

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Среди гексоз, абсорбируемых в желудочно-кишечном тракте, преобладают глюкоза, фруктоза и галактоза. Они образуются из поступающих с пищей крахмала, сахарозы и лактозы соответственно. В тканях, в первую очередь в печени, функционируют специальные пути превращения фруктозы и галактозы в глюкозу.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Основными метаболическими процессами, обеспечивающими усвоение глюкозы, являются гликолиз и пентозофосфатный путь. Незначительным в количественном плане, но весьма важным для экскреции продуктов метаболизма и чужеродных веществ (ксенобиотиков) в виде глюкоуронидов является образование глюкоуроновой кислоты из глюкозы (путь уроновой кислоты). Недостаточная эффективность этого пути приводит к идиопатической пентозурии. Полным отсутствием определенного фермента данного пути у приматов и морских свинок объясняется тот факт, что для человека (в отличие от большинства других млекопитающих) аскорбиновая кислота (витамин С) является необходимым компонентом пищи. Недостаточная активность ферментов, участвующих в метаболизме фруктозы и галактозы, приводит к таким метаболическим заболеваниям, как идиопатическая фруктозурия и галактоземия. Фруктоза используется для парентерального питания, однако при высоких концентрациях она может вызывать снижение уровня адениновых нуклеотидов в печени и приводить к некротическому поражению этого органа.

ПУТЬ УРОНОВЫХ КИСЛОТ

Помимо описанных выше главных путей метаболизма глюкозо-6-фосфата имеется также путь, по которому происходит превращение глюкозы в глюкуроновую и аскорбиновую кислоты и пентозы, получивший название «путь уроновых кислот». Он является альтернативным окислительным путем метаболизма глюкозы, но, как и пентозофосфатный путь, не приводит к образованию АТР.

Глюкуроновая кислота образуется из глюкозы по пути уроновых кислот в результате реакций, приведенных на рис. 21.1. Глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат, который затем взаимодействует с уридинтрифосфатом (UTP) с образованием активного нуклеотида уридиндифосфатглюкозы (UDP-глюкозы). Последнюю реакцию катализирует фермент UDP-глюкозопирофосфорилаза. Реакции, предшествующие этой стадии, характерны для процесса гликогенеза в печени (см. рис. 19.1). UDP-глюкоза окисляется по С-6 с образованием глюкуроната, причем процесс протекает в две стадии. Продуктом стадии окисления, катализируемой NAD-зависимой UDP-глюкозодегидрогеназой, является UDP-глюкуронат.

UDP-глюкуронат является «активной» формой глюкуроната в реакциях, в результате которых происходит включение глюкуроновой кислоты в протеогликаны, и в реакциях, в которых глюкуронат конъюгируется с такими субстратами, как стероидные гормоны, некоторые лекарственные препараты или билирубин (рис. 33.13).

В результате NADPH-зависимой реакции глюкуронат восстанавливается до L-гулоната (рис. 21.1), который является непосредственным предшественником аскорбиновой кислоты у животных, способных синтезировать этот витамин. В организме человека и других приматов, а также морских свинок аскорбиновая кислота не образуется. Гулонат окисляется до 3-кето-L-гулоната, который затем декарбоксилируется с образованием L-ксилулозы.

Ксилулоза в виде D-изомера участвует в пентозофосфатном пути, а из кетогулоната, как показано на рис. 21.1, образуется L-изомер. Для взаимодействия этих двух путей метаболизма необходимо превращение L-ксилулозы в D-изомер; оно осуществляется путем NADPH-зависимого восстановления L-ксилулозы до ксилитола, который затем окисляется до D-ксилулозы в реакции с участием NAD. D-ксилулоза фосфорилируется с образованием D-ксилулозо-5-фосфата, который включается в пентозофосфатный путь.

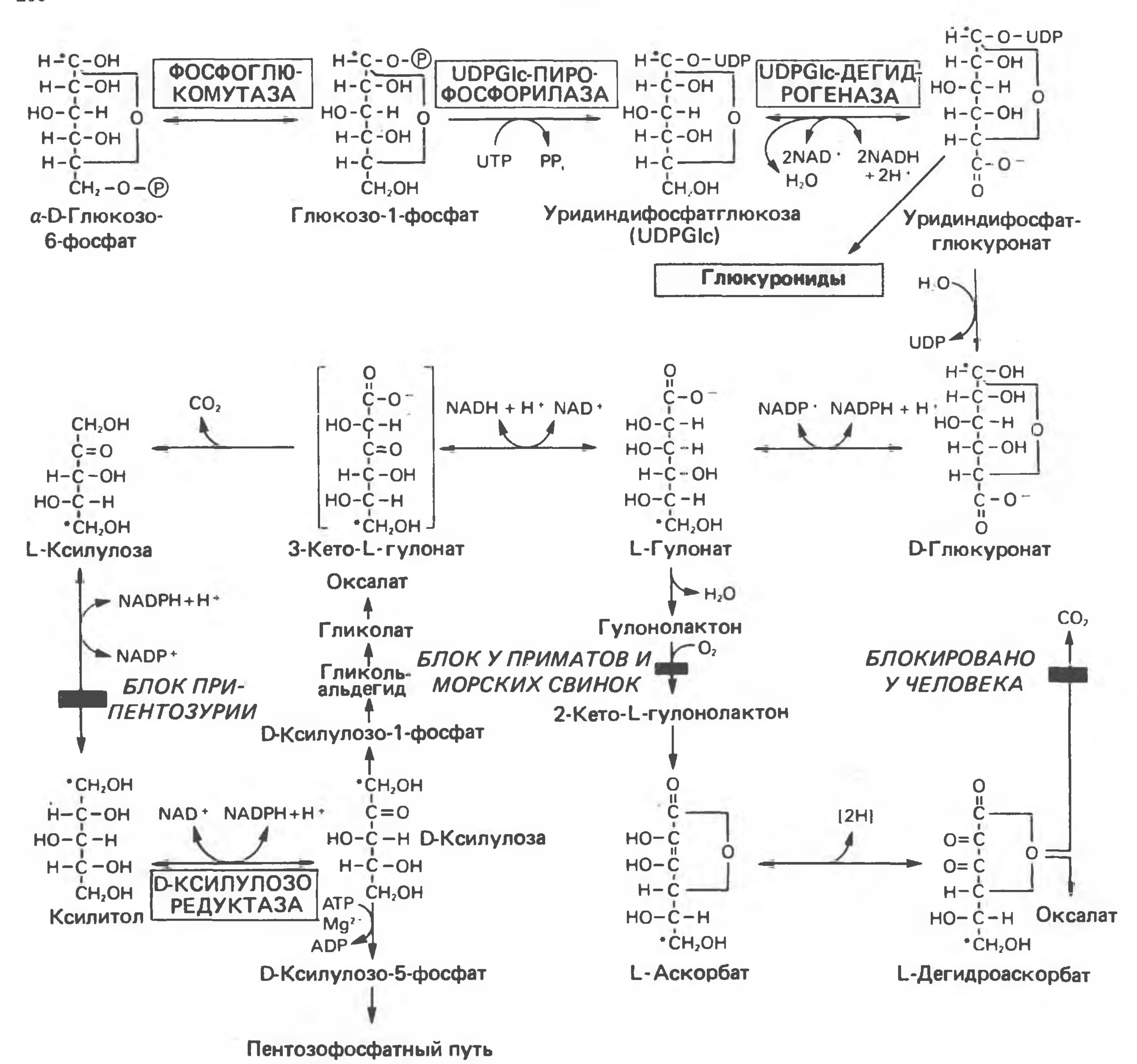


Рис. 21.1. Путь уроновой кислоты. Звездочка показывает судьбу атома углерода в положении С-1 глюкозы; Ⓟ — PO_3^{2-}.

Клинические аспекты

При редком наследственном заболевании идиопатической пентозурии в моче появляется большое количество L-ксилулозы. В настоящее время считают, что это обусловлено отсутствием у больных пентозурией фермента, необходимого для восстановления L-ксилулозы до ксилитола. В то же время парентеральное введение ксилитола может приводить к оксалозу, при котором происходит отложение оксалата кальция в почках и мозгу; оксалат образуется из D-ксилулозы, при этом промежуточными соединениями являются ксилулозо-1-фосфат, гликольальдегид и гликолат (см. рис. 21.1).

Различные лекарственные препараты значительно увеличивают скорость превращения глюкозы по пути уроновой кислоты. Например, введение крысам барбитала или хлорбутанола приводит к значительному увеличению скорости превращения глюкозы в глюкуронат, L-гулонат и аскорбат. Такое же влияние на биосинтез L-аскорбиновой кислоты оказывают многие лекарственные препараты, в том числе различные барбитураты, аминопирин и антипирин. Следует отметить, что два последних препарата увеличивают экскрецию L-ксилулозы у больных пентозурией.

МЕТАБОЛИЗМ ФРУКТОЗЫ

Фруктоза может быть фосфорилирована с образованием фруктозо-6-фосфата в реакции, катализируемой гексокиназой — ферментом, который катализирует также реакции фосфорилирования глюкозы и маннозы (рис. 21.2). Однако сродство данного фермента к фруктозе гораздо ниже, чем к глюкозе, поэтому маловероятно, что это превращение находится на главном пути усвоения фруктозы.

В печени имеется другой фермент, называемый фруктокиназой, который катализирует перенос фосфата от ATP на фруктозу с образованием фруктозо-1-фосфата. Фруктокиназа обнаружена также в почках и кишечнике. Этот фермент не катализирует фосфорилирование глюкозы, на его активность (в отличие от активности глюкокиназы) не влияют ни голодание, ни инсулин; это позволяет понять, почему у больных диабетом выведение фруктозы из крови происходит с нормальной скоростью. Значение $K_м$ фруктокиназы печени для фруктозы очень мало, что указывает на чрезвычайно высокое сродство фермента к данному субстрату. Образование фруктозо-1-фосфата является, по-видимому, главным путем фосфорилирования фруктозы. При отсутствии в печени фруктокиназы наблюдается идиопатическая фруктозурия.

Фруктозо-1-фосфат расщепляется на D-глицеральдегид и дигидроксиацетонфосфат альдолазой B, которая присутствует в печени и способна также расщеплять фруктозо-1,6-бисфосфат. Отсутствие этого фермента вызывает наследственную нетолерантность к фруктозе. D-глицеральдегид может включаться в гликолиз после фосфорилирования с образованием глицеральдегид-3-фосфата. Эта реакция катализируется другим ферментом печени — триозокиназой. Два триозофосфата — дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат — могут либо трансформироваться далее по гликолитическому пути, либо конденсироваться под действием альдолазы с последующим превращением в глюкозу. Метаболизм фруктозы в печени происходит главным образом по последнему пути.

При генетически обусловленных нетолерантности к фруктозе или недостаточной активности фруктозо-1,6-дифосфатазы наблюдается индуцируемая фруктозой гипогликемия, возникающая несмотря на наличие больших запасов гликогена. Вероятно, фруктозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат ингибируют фосфорилазу печени по аллостерическому механизму.

Если у подопытного животного удалить печень и кишечник, то вводимая в кровь фруктоза не превращается в глюкозу и животное может погибнуть от гипогликемии, если ему не сделать инъекцию глюкозы. Имеются данные о том, что у человека фруктоза может превращаться в почках в глюкозу и лактат. У человека в отличие от крыс значительное количество фруктозы, образующейся при расщеплении сахарозы, прежде чем поступить в систему воротной вены, превращается в глюкозу в клетках стенки кишечника. Метаболизм фруктозы в печени по гликолитическому пути происходит гораздо быстрее, чем метаболизм глюкозы. Это объясняется тем, что фруктоза минует стадию, характерную для метаболизма глюкозы, катализируемую фосфофруктокиназой. На этой стадии осуществляется метаболический контроль скорости катаболизма глюкозы. Это позволяет фруктозе интенсифицировать в печени процессы метаболизма, ведущие к синтезу жирных кислот, их эстерификацию и секрецию липопротеинов очень низкой плотности; в результате может увеличиваться концентрация триацилглицеролов в плазме крови.

Свободная фруктоза обнаружена в семенной жидкости; она также секретируется в больших количествах в систему кровообращения плода у копытных и китообразных и накапливается в околоплодной и аллантоидной жидкостях.

Метаболизм сорбитола

В хрусталике глаза человека обнаружены и фруктоза, и сорбитол, причем при диабете их концентрация увеличивается. Они, вероятно, участвуют в патогенезе диабетической катаракты. Образование фруктозы из глюкозы (рис. 21.2) происходит по «пути

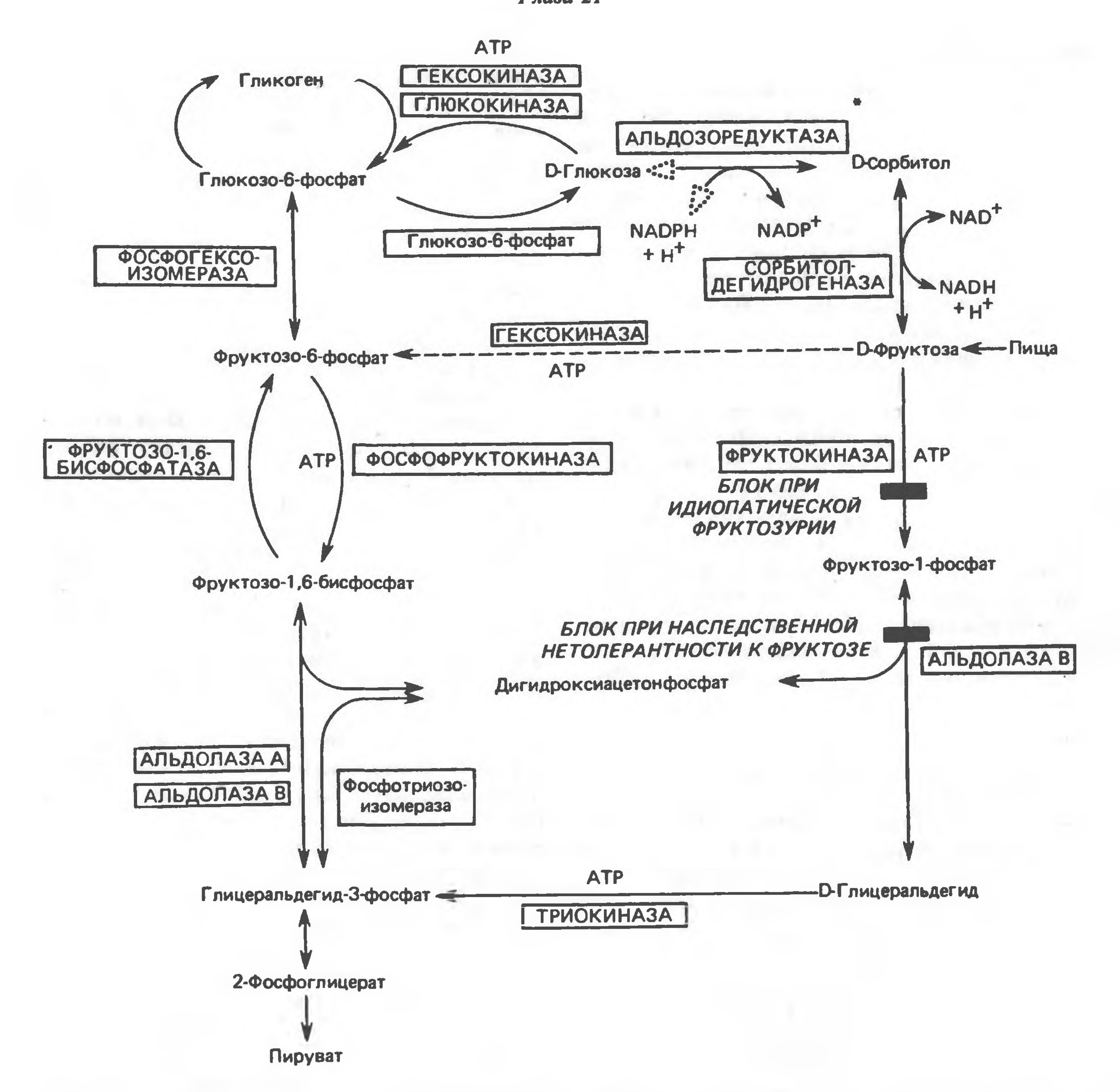


Рис. 21.2. Метаболизм фруктозы. Альдолаза А обнаружена во всех тканях, кроме печени, в которой имеется только альдолаза В. Альдозоредуктаза не обнаружена в печени.

сорбитола» (полиола, не обнаруженного в печени), причем этот путь активируется у больных диабетом при увеличении концентрации глюкозы. Глюкоза восстанавливается NADPH до сорбитола в результате реакции, катализируемой альдозоредуктазой, затем сорбитол окисляется до фруктозы в присутствии NAD и сорбитолдегидрогеназы (полиолдегидрогеназы). Сорбитол с трудом проникает через клеточные мембраны и поэтому накапливается в клетке. Альдозоредуктаза обнаружена в плаценте овцы, она обеспечивает образование сорбитола, который секретируется в кровь плода. Присутствие сорбитолдегидрогеназы в печени, в том числе и в печени плода, обеспечивает превращение сорбитола во фруктозу. При внутривенном введении сорбитол действительно превращается преимущественно во фруктозу, а не в глюкозу; при пероральном введении всасывание его в кишечнике незначительно, и он ферментируется бактериями толстого кишечника с образованием ацетата и H_2.

Сладкие продукты с сорбитолом могут вызывать боли в животе при нетолерантности к этому веществу.

МЕТАБОЛИЗМ ГАЛАКТОЗЫ

Галактоза образуется при гидролизе в кишечнике дисахарида лактозы (молочного сахара). В печени она легко превращается в глюкозу. Способность печени осуществлять это превращение может быть использована в качестве функциональной пробы — теста на толерантность к галактозе. Путь превращения галактозы в глюкозу показан на рис. 21.3.

Галактоза фосфорилируется в результате реакции 1, катализируемой галактокиназой (донором фосфата служит ATP). Продукт реакции — галактозо-1-фосфат реагирует с уридиндифосфат-глюкозой (UDP-глюкозой) с образованием уридиндифосфатгалактозы (UDP-галактозы) и глюкозо-1-фосфата. На этой стадии (реакция 2), катализируемой ферментом галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазой, галактоза занимает место глюкозы в UDP-глюкозе с образованием UDP-галактозы. Превращение галактозы в глюкозу (реакция 3) происходит в составе галактозосодержащего нуклеотида. Эта реакция, продуктом которой является UDP-глюкоза, катализируется эпимеразой. Реакция эпимеризации, вероятно, включает стадии окисления и восстановления по C-4 с участием NAD в качестве кофермента. Наконец, глюкоза высвобождается из UDP-глюкозы в виде глюкозо-1-фосфата (реакция 4), возможно, после включения в гликоген и последующего его фосфоролиза.

Реакция 3 легко обратима, таким путем глюкоза может превращаться в галактозу, и последняя, следовательно, не является незаменимым компонентом пищи. Галактоза необходима для образования не только лактозы, но и гликолипидов (цереброзидов), протеогликанов и гликопротеинов.

При синтезе лактозы в молочной железе сначала из глюкозы и нуклеотида при участии вышеперечи-

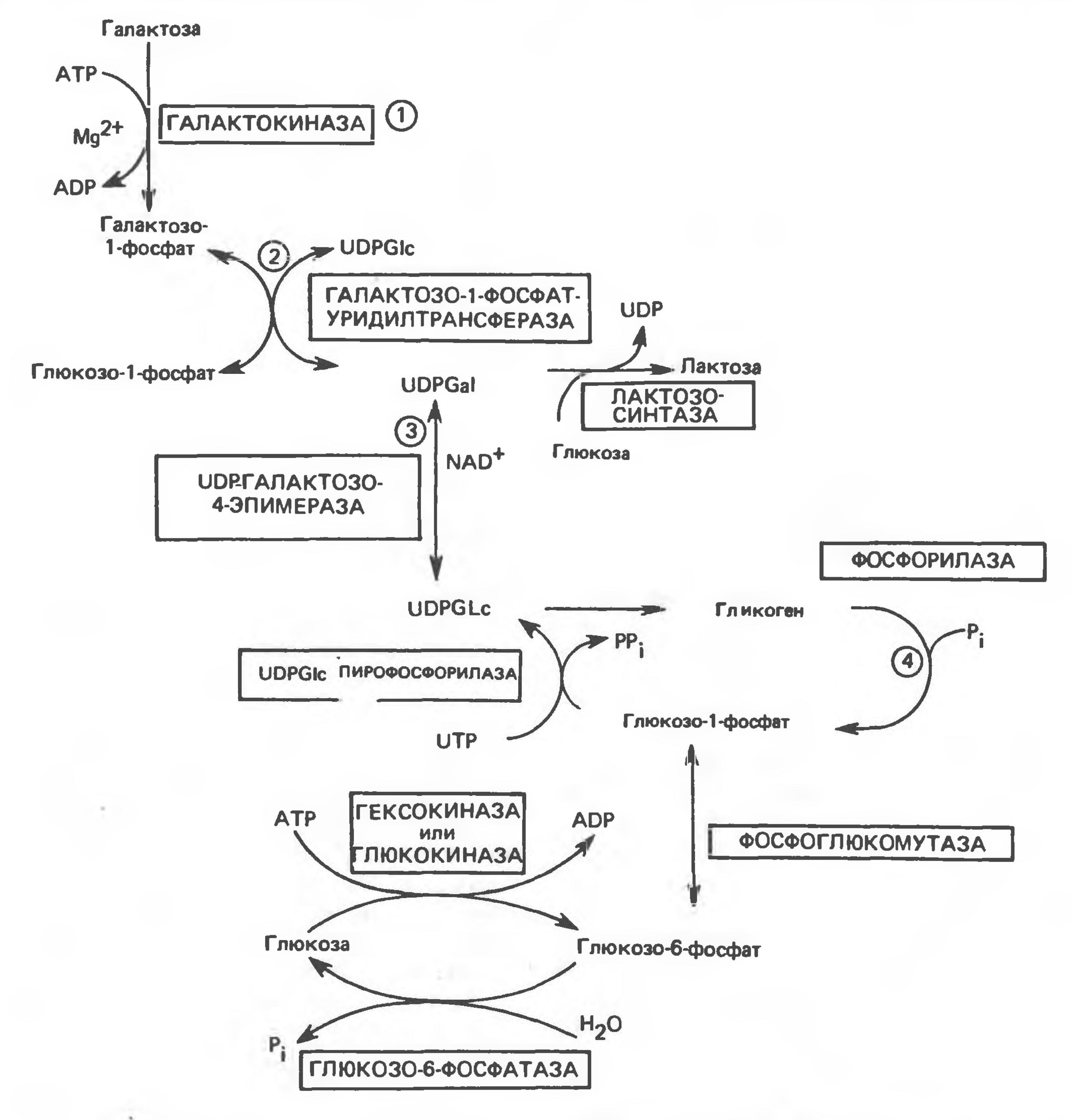


Рис. 21.3. Путь превращения галактозы в глюкозу и путь синтеза лактозы.

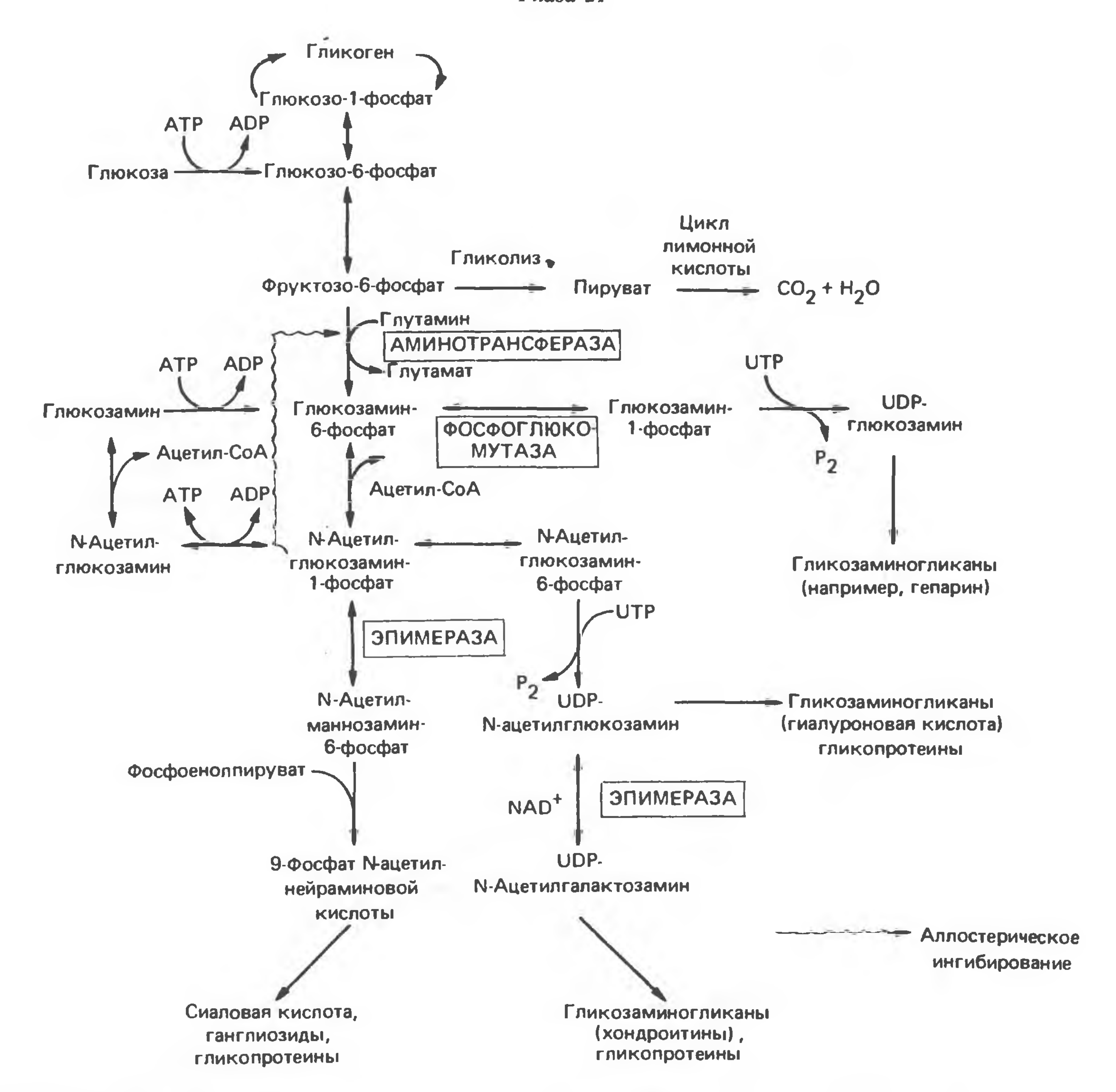


Рис. 21.4. Схема взаимосвязи метаболизма аминосахаров. UDP-глюкозамин — аналог UDP-Glc. Другие пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды могут аналогично связывать сахара или аминосахара. Примерами таких соединений могут служит TDP-глюкозамин и TDP-N-ацетилглюкозамин.

сленных ферментов образуется UDP-галактоза. Затем она вступает в катализируемую лактозосинтазой реакцию с глюкозой, в результате которой образуется лактоза.

Клинические аспекты

Нарушение метаболизма галактозы наблюдается при галактоземии, которая может быть вызвана наследственными дефектами в любом из трех ферментов, обозначенных 1, 2, 3 на рис. 21.3. Наиболее хорошо известным является недостаток уридилтрансферазы (2). При увеличении концентрации галактозы в крови повышается ее концентрация в тканях. В тканях глаза она восстанавливается альдозоредуктазой с образованием соответствующего полиола (галактитола). Накопление галактитола способствует развитию катаракты. Весьма тяжелые последствия наблюдаются при дефиците уридилтрансферазы: в печени происходит накопление галактозо-1-фосфата, при этом соответственно снижается концентрация неорганического фосфата. В результате возникает нарушение функции печени, а затем расстройство психики.

Если при наследственном дефиците галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы (реакция 2), приводящем к нарушению метаболизма галактозы в печени и красных кровяных тельцах, эпимераза (реакция 3) присутствует в достаточном количестве, то у больных может происходить образование UDP-

галактозы из глюкозы. Это объясняет, почему дети с таким заболеванием могут нормально расти и развиваться при назначении диеты, из которой исключена галактоза (такая диета назначается для предотвращения тяжелых форм заболевания). Описано несколько различных генетических дефектов, которые вызывают не полный, а частичный дефицит трансферазы. Поскольку обычно этот фермент присутствует в организме в избытке, снижение его активности до 50% (и даже ниже) может не сопровождаться клиническими проявлениями заболевания; последние наблюдаются у гомозиготных индивидуумов. В тех случаях, когда имеется дефицит эпимеразы в эритроцитах, при наличии данного фермента в печени и других органах симптомы заболевания не обнаруживаются.

Метаболизм аминосахаров (гексозаминов) (рис. 21.4)

Аминосахара являются важными компонентами гликопротеинов (см. гл. 54), некоторых гликосфинголипидов (например, ганглиозидов, см. гл. 15) и гликозаминогликанов (см. гл. 54). Наибольшее значение среди них имеют глюкозамин, галактозамин, маннозамин (все они — гексозамины) и С-9-соединение — сиаловая кислота. Главной сиаловой кислотой, обнаруженной в тканях человека, является N-ацетилнейраминовая кислота (NeuAc). Схема реакций взаимных превращений аминосахаров представлена на рис. 21.4; наиболее существенные моменты ее следующие: (1) главным аминосахаром является глюкозамин; он образуется из фруктозо-6-фосфата в форме глюкозамин-6-фосфата, причем донором аминогруппы является глутамин; (2) аминосахара функционируют в основном в N-ацетилированной форме, донором ацетила является ацетил-CoA; (3) N-ацетилманнозамин-6-фосфат образуется путем эпимеризации N-ацетилглюкозамин-6-фосфата; (4) NeuAc образуется в результате конденсации маннозамин-6-фосфата с фосфоенолпируватом; (5) галактозамин образуется путем эпимеризации UDP-N-ацетилглюкозамина (UDPGlcNAc) в UDP-N-ацетилгалактозамин (UDP-GalNAc); (6) аминосахара используются для биосинтеза гликопротеинов и других соединений в форме нуклеотидсахаров, основными из которых являются UDPGlcNAc, UDPGalNAc и CMPNeuAc.

ЛИТЕРАТУРА

Brown D. H., Brown B. I. Some inborn errors of carbohydrate metabolism. Page 391. In: MTP International Review of Science, Vol 5, Whelan W. J. (ed.), Butterworth, 1975.

Dickens F., Randel P. J., Whelan W. J. (ed.). Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, 2 vols, Academic Press, 1968.

Huijing F. Textbook errors, Galactose metabolism and galactosemia, Trends Biochem. Sci., 1978, **3**, N 129.

James H. M. et al. Models for the metabolic production of oxalate from xylitol in humans, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1982, **60**, 117.

Kador P. F., Akagi Y., Kinoshita J. H. The effects of aldose reductase and its inhibition on sugar cataract formation, Metabolism, 1986, **35**, 15.

Macdonald I., Vrana A. (eds). Metabolic Effects of Dietary Carbohydrates, Karger, 1986.

Randle P. J., Steiner D. F., Whelan W. J. (eds). Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, Vol 3, Academic Press, 1981.

Sperling O., de Vries A. (eds). Inborn Errors of Metabolism in Man, Karger, 1978.

Stanbury J. B. et al. (eds). The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed. McGraw-Hill, 1983.

Глава 22

Регуляция метаболизма углеводов

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Для того чтобы метаболические пути могли функционировать согласованно и удовлетворять потребности индивидуальных клеток, органов или организма в целом, они должны быть регулируемыми. Регуляция метаболических путей, снабжающих организм «топливными» молекулами, например углеводами, необходима, поскольку они должны поступать постоянно при различных условиях и при возникновении патологических состояний. Этот тип регуляции метаболизма направлен на поддержание, как принято говорить, «энергетического гомеостаза».

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Энергетический гомеостаз обеспечивает энергетические потребности различных тканей, используя при необходимости альтернативные виды «топлива». Он включает транспорт различных субстратов в организме, а также реализацию механизмов, осуществляющих регуляцию уровня субстратов в крови. Эти механизмы обеспечивают непрерывную поставку тканям глюкозы между приемами пищи и при голодании. Различные причины, обычно связанные с недостаточной активностью того или иного фермента, приводят к гипогликемии (снижению содержания уровня сахара в крови). Патологические изменения эндокринной системы вызывают нарушение углеводного обмена. Так, недостаток инсулина приводит к сахарному диабету и гипергликемии.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА

Регуляция скорости протекания реакций определенного метаболического пути часто осуществляется путем изменения скорости одной или, возможно, двух ключевых реакций, катализируемых **«регуляторными ферментами»**. Некоторые физико-химические факторы, контролирующие скорость ферментативной реакции, например концентрация субстрата (см. гл. 9), имеют первостепенное значение при регуляции общей скорости образования продукта данного пути метаболизма. В то же время другие факторы, влияющие на активность ферментов, например температура и pH, у теплокровных животных постоянны и практически не имеют значения для регуляции скорости процессов метаболизма. (Обратите, однако, внимание на изменение значения pH по ходу желудочно-кишечного тракта и его влияние на пищеварение; см. гл. 53.)

Равновесные и неравновесные реакции

При достижении равновесия прямая и обратная реакции протекают с одинаковой скоростью, и, следовательно, концентрации продукта и субстрата остаются постоянными. Многие метаболические реакции протекают именно в таких условиях, т.е. являются «равновесными».

$$A \longleftrightarrow B \longleftrightarrow C \longleftrightarrow D$$

В стационарных условиях in vivo протекание реакции слева направо возможно за счет непрерывного поступления субстрата и постоянного удаления продукта D. Такой путь мог бы функционировать, но при этом оставалось бы мало возможностей для регуляции его скорости путем изменения активности фермента, поскольку увеличение активности приводило бы только к более быстрому достижению равновесия.

В действительности в метаболическом пути, как правило, имеются одна или несколько реакций «неравновесного» типа, концентрации реактантов которых далеки от равновесных. При протекании реакции в равновесном состоянии происходит рассеивание свободной энергии в виде теплоты, и реакция оказывается практически необратимой.

Тепло

$$A \longleftrightarrow B \longrightarrow C \longleftrightarrow D$$

Неравновесная реакция

По такому пути поток реактантов идет в определенном направлении, однако без системы контроля наступит его истощение. Концентрации ферментов, катализирующих неравновесные реакции, обычно невелики, и активность ферментов регулируется специальными механизмами; эти механизмы функционируют по принципу «одноходового» клапана и позволяют контролировать скорость образования продукта.

Определяющая скорость реакция метаболического пути

Определяющая скорость реакция — это первая реакция метаболического пути, фермент которой насыщается субстратом. Она может быть определена как «неравновесная» реакция, характеризующаяся величиной $K_м$, значительно меньшей, чем нормальная концентрация субстрата. Первая реакция гликолиза, катализируемая гексокиназой (рис. 22.2), является примером такой определяющей скорость реакции.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Гипотетический путь метаболизма, включающий стадии A, B, C, D, показан на рис. 22.1, на этом пути реакции $A \leftrightarrow B$ и $C \leftrightarrow D$ являются равновесными, а реакция $B \rightarrow C$ — неравновесной. Скорость потока в таком метаболическом пути может регулироваться доступностью субстрата A. Это зависит от его поступления из крови, что в свою очередь зависит от количества пищи, поступившей в кишечник, или же от скоростей некоторых ключевых реакций, в результате которых основные субстраты высвобо-

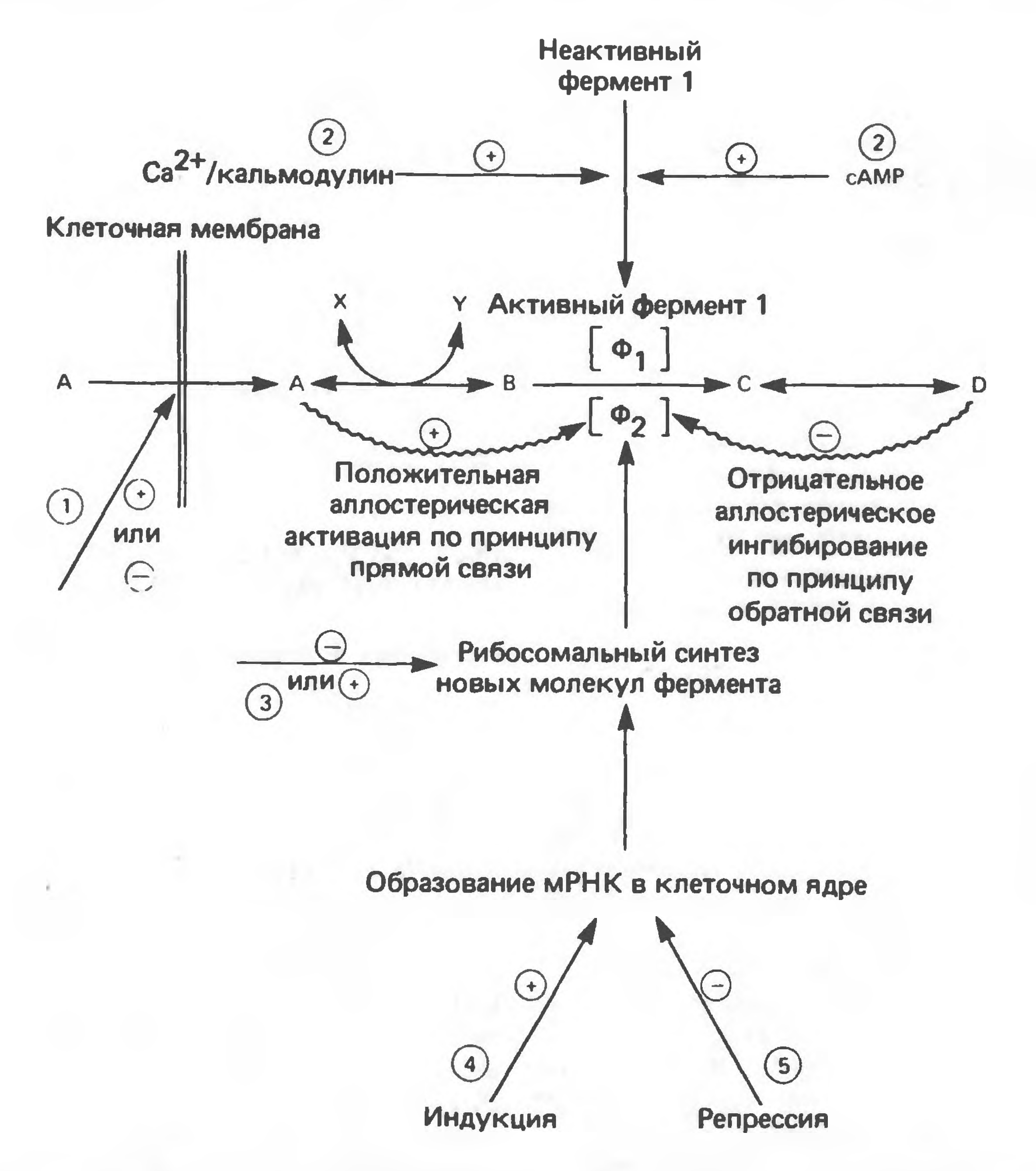


Рис. 22.1. Механизмы регуляции ферментативных реакций. Цифры, заключенные в кружки, указывают вероятные участки действия гормонов. 1 — изменение проницаемости мембраны; 2 — переход фермента из неактивной формы в активную; 3 — изменение скорости трансляции мРНК на рибосомальном уровне; 4 — индукция образования новой мРНК; 5 — репрессия образования мРНК.

ждаются и поступают в кровь, где их концентрация поддерживается на определенном уровне. Примерами могут служить пусковая реакция, катализируемая фосфорилазой печени, которая обеспечивает кровь глюкозой, а также реакция, катализируемая гормонзависимой липазой жировой ткани, поставляющая свободные жирные кислоты. Скорость процесса зависит также от способности субстрата А проникать через клеточные мембраны, от эффективности удаления конечного продукта D и от доступности косубстратов или кофакторов, обозначенных X и Y на рис. 22.1.

Ферменты, катализирующие неравновесные реакции, чаще всего являются аллостерическими, и их регуляция быстро осуществляется по принципу «обратной связи» или «прямой связи» под действием **аллостерических модуляторов** в ответ на потребности клетки (см. гл. 9). Другие механизмы регуляции, связанные с действием гормонов, обеспечивают потребности организма в целом. Гормональная регуляция осуществляется с помощью нескольких механизмов (см. гл. 43), одним из которых является **ковалентная модификация** фермента путем **фосфорилирования** и **дефосфорилирования**. Этот процесс протекает быстро; одной из промежуточных стадий часто является образование **сАМР**, который в свою очередь стимулирует переход фермента из одной (например, неактивной) формы в другую. В процессе участвуют далее **сАМР-зависимая протеинкиназа**, которая катализирует фосфорилирование фермента, или специфические **фосфатазы**, катализирующие его дефосфорилирование. Активной формой может быть либо фосфорилированный фермент, как в случае ферментов, катализирующих пути **катаболизма** (например, фосфорилаза *a*), или дефосфорилированный фермент, как в случае ферментов, катализирующих процессы **биосинтеза** (например, гликогенсинтаза *a*).

Фосфорилирование некоторых регуляторных ферментов может осуществляться без участия сАМР и сАМР-зависимой протеинкиназы. Фосфорилирование этих ферментов зависит от таких метаболических сигналов, как изменение соотношения [ATP]/[ADP] (пример — пируватдегидрогеназа; рис. 22.3) или активность Ca^{2+}/кальмодулинзависимых протеинкиназ (пример — киназа фосфорилазы; рис. 19.5).

Синтез ферментов, контролирующих скорость метаболических путей, может изменяться под действием гормонов. Поскольку в этом случае происходит синтез новых белковых молекул, изменение активности происходит сравнительно медленно и чаще всего в ответ на изменение количества и состава поступающей пищи. Гормоны могут действовать как индукторы или репрессоры синтеза мРНК в ядре или как стимуляторы стадии трансляции белкового синтеза на уровне рибосом (гл. 41 и 43).

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ НА КЛЕТОЧНОМ И ФЕРМЕНТНОМ УРОВНЕ

Значительные нарушения метаболизма у животных при изменении состава пищи или баланса гормонов можно изучать, наблюдая за динамикой концентрации метаболитов в крови. Можно также изучать влияние этих изменений на отдельные органы, используя метод катетеризации, который позволяет измерять артериовенозную разницу концентраций исследуемого метаболита. Изменения метаболизма у интактных животных обусловлены часто дисбалансом обменных процессов в отдельных тканях, что обычно связано с изменением доступности метаболитов или изменением активности ключевых ферментов.

Большинство изменений метаболизма прямо или косвенно зависит от изменения доступности субстратов. Колебания концентрации субстратов в крови, обусловленные изменением их содержания в поступающей пище, могут влиять на скорость секреции гормонов, что в свою очередь вызывает изменения относительных скоростей различных путей метаболизма (часто путем влияния на активность ключевых ферментов, в результате чего компенсируется изменение доступности субстрата). Среди механизмов, регулирующих активность ферментов, участвующих в углеводном обмене, можно выделить три группы (табл. 22.1): (1) изменение скорости биосинтеза ферментов; (2) изменение активности фермента в результате ковалентной модификации; (3) аллостерические эффекты.

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА, ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА И ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ

Индукция и репрессия синтеза ферментов

Наиболее полно изученные изменения активности ферментов, которые, как считают, происходят при различном состоянии обмена веществ, приведены в табл. 22.1. Данные, представленные в этой таблице, относятся главным образом к ферментам печени. Рассматриваемые ферменты катализируют неравновесные реакции, которые с точки зрения физиологии являются односторонними. Часто эффекты «в прямом направлении» оказываются более выраженными, поскольку одновременно противоположным образом меняется активность ферментов, катализирующих изменения в обратном направлении (рис. 22.2). Необходимо отметить, что все ключевые ферменты, участвующие в каком-либо пути метаболизма, активируются или ингибируются координированно, об этом свидетельствуют данные, представленные в табл. 22.1. Ферменты, участвующие в использовании глюкозы, т. е. ферменты гликолиза и ли-

Таблица 22.1. Регуляторные и адаптивные ферменты крысы (главным образом ферменты печени)

Ферменты	Активность при приеме пищи богатой углеводами	Активность при голодании и диабете	Индуктор	Репрессор	Активатор	Ингибитор
Ферменты гликолиза и кликогенеза						
Гексикиназа						Глюкозо-6-фосфат[1]
Глюкокиназа	↑	↓	Инсулин			
Гликогенсинтазная система	↑	↓	Инсулин		Инсулин	Глюкагон (cAMP), фосфорилаза, гликоген
Фосфофруктокиназа-1	↑	↓	Инсулин		AMP[1], фруктозо-6-фосфат[1], P_i[1], фруктозо-2,6-биофосфат[1]	Цитрат (жирные кислоты, кетоновые тела)[1], ATP[1], глюкагон (cAMP)
Пируваткиназа	↑	↓	Инсулин, фруктоза		Фруктозо-1,6-бисфосфат[1]	ATP, аланин, глюкагон (cAMP), адреналин
Пируватдегидрогеназа	↑	↓			CoA, NAD, инсулин[2], ADP, пируват	Ацетил-CoA, NADH, ATP (жирные кислоты, кетоновые тела)
Ферменты глюконеогенеза						
Пируваткарбоксилаза	↓	↑	Глюкокортикоиды, глюкагон, адреналин	Инсулин	Ацетил-CoA[1]	ADP[1]
Фосфоенолпируваткарбоксикиназа	↓	↑	Глюкокортикоиды, глюкагон, адреналин	Инсулин	Глюкагон ?	
Фруктозо-1,6-бисфосфотаза	↓	↑	Глюкокортикоиды, глюкагон, адреналин	Инсулин	Глюкагон (cAMP)	Фруктозо-1,6-бисфосфат[1],AMP[1],фруктозо-2,6-бисфосфат
Глюкозо-6-фосфатаза	↓	↑	Глюкокортикоиды, глюкагон, адреналин	Инсулин		
Ферменты пентозофосфатного пути и липогенеза						
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	↑	↓	Инсулин			
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	↑	↓	Инсулин			
«Яблочный» фермент	↑	↓	Инсулин			
АТР-цитрат-лиаза	↑	↓	Инсулин			ADP
Ацетил-CoA-карбоксилаза	↑	↓	Инсулин ?		Цитрат[1], инсулин	Длинноцепочечный ацил-CoA, cAMP, глюкагон
Синтаза жирных кислот	↑	↓	Инсулин			

[1] Аллостерический.
[2] В жировой ткани, но не в печени.

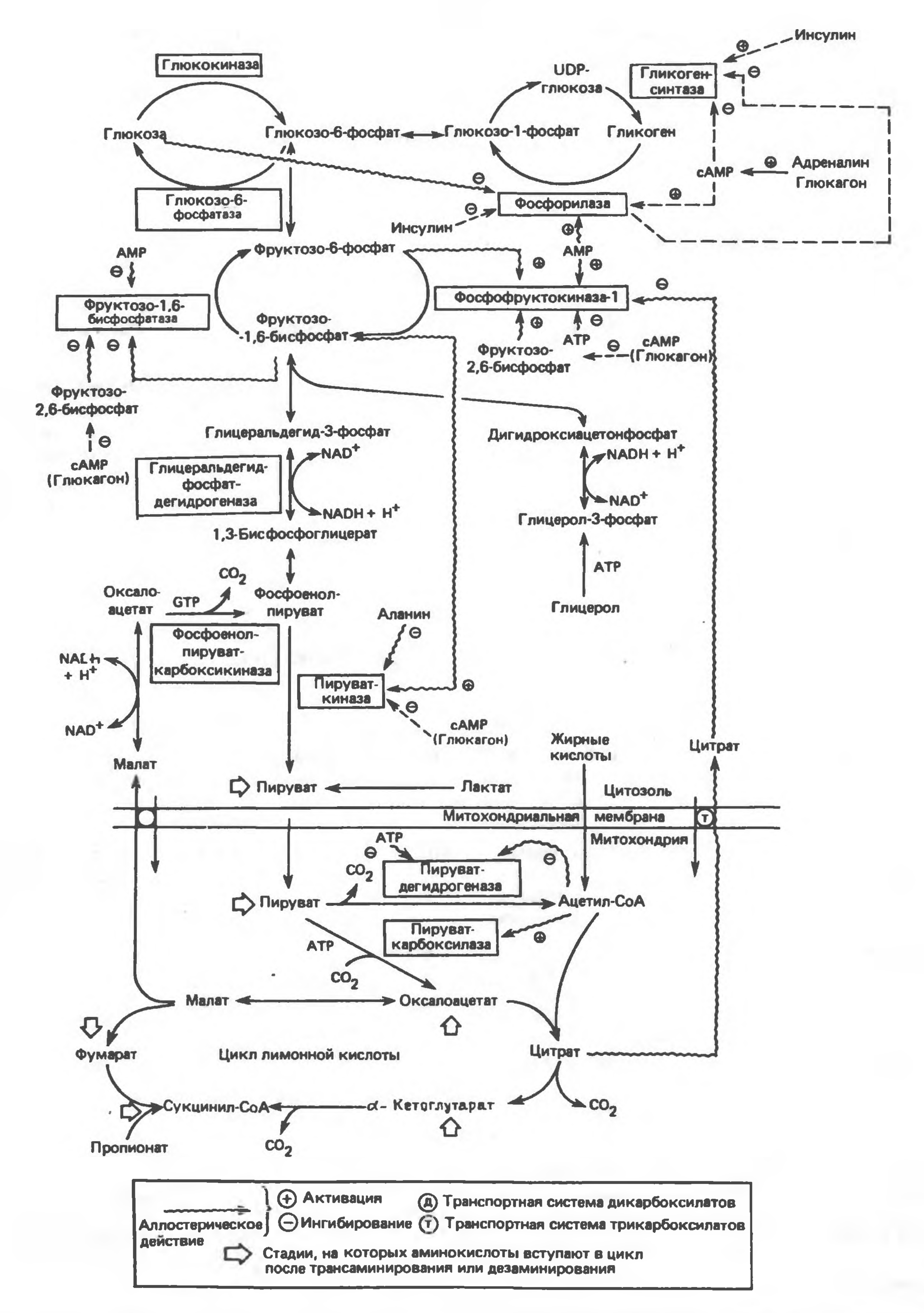


Рис. 22.2. Ключевые ферменты, участвующие в регуляции гликолиза, глюконеогенеза и метаболизма гликогена в печени. Указанное на схеме место действия гормона не предполагает прямого влияния на соответствующий фермент. Влияние cAMP на фосфофруктокиназу-1 и на фруктозо-1,6-бисфосфатазу осуществляется путем сочетания ковалентной модификации и аллостерического эффекта (см. рис. 22.4). Аланин в высоких концентрациях ингибирует гликолиз на стадии, катализируемой пируваткиназой, и, таким образом, действует как «сигнал глюконеогенеза».

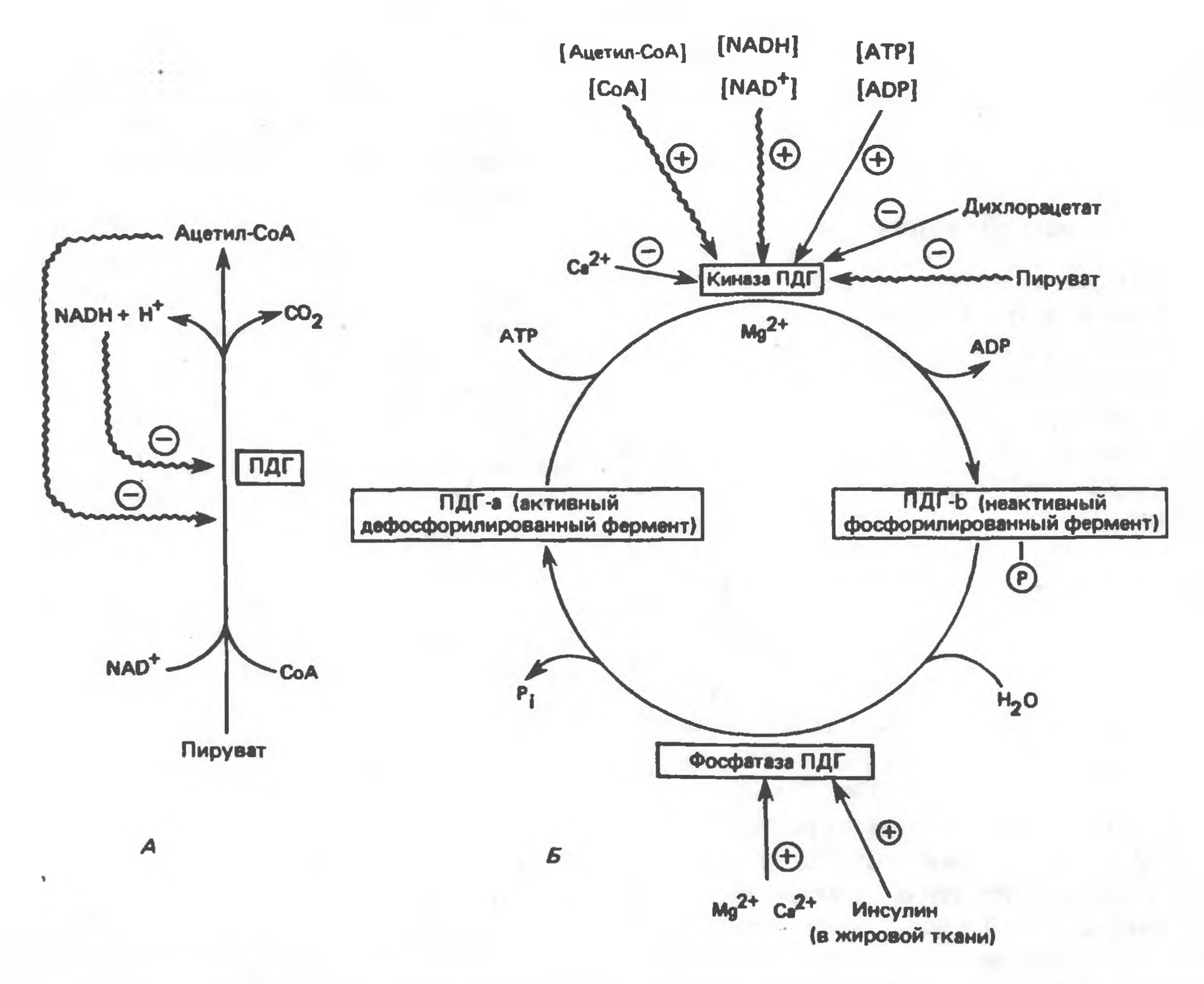


Рис. 22.3. Регуляция активности пируватдегидрогеназы (ПДГ). Аллостерические эффекты показаны волнистыми стрелками. *А* — регуляция путем ингибирования конечным продуктом; *Б* — регуляция путем взаимного превращения активной и неактивной форм фермента.

погенеза, становятся более активными при избытке глюкозы; в этих условиях активность ферментов, катализирующих образование глюкозы по пути глюконеогенеза, уменьшается. Секреция инсулина, которая изменяется в зависимости от концентрации глюкозы в крови, регулирует активность ферментов, участвующих в гликолизе. Вместе с глюкокортикоидами инсулин контролирует также активность ферментов, катализирующих реакции глюконеогенеза. Изменения активности, которые обусловлены синтезом ферментов, можно предотвратить с помощью веществ, блокирующих синтез белка, таких, как пуромицин и этионин.

Обе дегидрогеназы пентозофосфатного пути можно классифицировать как адаптивные ферменты, поскольку их активность увеличивается у животных в условиях хорошего питания, а также при введении инсулина животным, страдающим диабетом. При диабете и голодании эти ферменты малоактивны. «Яблочный» фермент и ATP-цитратлиаза ведут себя подобным образом; это позволяет заключить, что они участвуют в липогенезе, а не в глюконеогенезе.

Ковалентная модификация

Активность **пируватдегидрогеназы** может регулироваться как путем фосфорилирования, катализируемого ATP-специфичной киназой и приводящего к уменьшению активности, так и путем дефосфорилирования под действием фосфатазы, приводящего к увеличению активности дегидрогеназы. При увеличении соотношений [ацетил-CoA]/[CoA], [NADH]/[NAD^+] и [ATP]/[ADP] киназа становится более активной. Следовательно, пируватдегидрогеназа и гликолиз **ингибируются при окислении жирных кислот**, в процессе которого эти соотношения увеличиваются (рис. 22.3). При голодании активность дегидрогеназы уменьшается, а при действии инсулина увеличивается в жировой ткани (но не в печени). **Глюкагон ингибирует гликолиз и активирует процесс глюконеогенеза** в печени путем увеличения концентрации cAMP, что в свою очередь вызывает повышение активности cAMP-зависимой протеинкиназы; последняя фосфорилирует и инактивирует **пируваткиназу**. Глюкагон влияет также на концентрацию

фруктозо-2,6-бисфосфата, а следовательно, и на протекание гликолиза и глюконеогенеза; эти вопросы рассматриваются ниже.

Аллостерическая модификация

Аллостерический контроль осуществляется при регуляции активности ряда ферментов углеводного обмена. При биосинтезе в ходе глюконеогенеза оксалоацетата из бикарбоната и пирувата, катализируемого **пируваткарбоксилазой**, в качестве аллостерического активатора выступает ацетил-СоА. Последний изменяет конформацию белка, в результате уменьшается величина $K_м$ для бикарбоната. Этот эффект имеет важное значение для саморегуляции промежуточного обмена веществ, поскольку ацетил-СоА, образующийся из пирувата, активирует пируваткарбоксилазу и тем самым способствует образованию оксалоацетата и его дальнейшему окислению в цикле лимонной кислоты. Активация пируваткарбоксилазы и ингибирование пируватдегидрогеназы, которые вызываются ацетил-СоА, образующимся при окислении жирных кислот, позволяют понять тормозящее действие окисления жирных кислот на окисление пирувата и активирующее влияние на глюконеогенез в печени. Как в печени, так и в почках регуляция активностей пируватдегидрогеназы и пируваткарбоксилазы имеет реципрокный характер, благодаря этому метаболическая судьба пирувата изменяется при переходе от окисления углеводов, начинающегося с гликолиза, к глюконеогенезу (рис. 22.2). Окисление жирных кислот обеспечивает глюконеогенез, поставляя АТР, необходимый для протекания реакций, которые катализируются пируваткарбоксилазой и фосфоенолпируваткарбоксикиназой.

Фосфофруктокиназа (фосфофруктокиназа-1) является еще одним ферментом, регуляция которого осуществляется по принципу обратной связи. Этот фермент играет ключевую роль в регуляции гликолиза. Фосфофруктокиназа-1 ингибируется цитратом и АТР и активируется АМР. Последний функционирует как своего рода индикатор энергетического состояния клетки. Благодаря присутствию **аденилаткиназы** в клетках печени и многих других тканей быстро достигается равновесие в реакции

$$ATP + AMP \leftrightarrow 2ADP$$

Таким образом, при расходовании АТР в потребляющих энергию реакциях и образовании ADP возрастает концентрация АМР. Поскольку в исходном равновесии концентрация АТР может в 50 раз превышать концентрацию АМР, то при сравнительно небольшом уменьшении концентрации АТР может многократно увеличиться концентрация АМР. Таким образом, большое увеличение концентрации АМР действует как своего рода метаболический усилитель при незначительном изменении концентрации АТР. Данный механизм делает фосфофруктокиназу-1 **высокочувствительной к небольшим изменениям энергетического состояния клетки** и позволяет **регулировать количество углеводов, подвергающихся гликолизу**, до их вступления в цикл лимонной кислоты. Увеличение концентрации АМР позволяет также объяснить, почему процесс гликолиза усиливается при недостатке кислорода, когда концентрация АТР снижается. Одновременно АМР активирует фосфорилазу и тем самым усиливает гликогенолиз. Ингибирование фосфофруктокиназы-1 цитратом и АТР является еще одним путем, который объясняет тормозящее действие окисления жирных кислот на окисление глюкозы; это ингибирование объясняет также **эффект Пастера**, заключающийся в том, что аэробное окисление субстратов в цикле лимонной кислоты ингибирует анаэробное расщепление глюкозы. Следствием ингибирования фосфофруктокиназы-1 является также накопление глюкозо-6-фосфата, который снижает поступление глюкозы во внепеченочные ткани путем аллостерического ингибирования гексокиназы.

Роль фруктозо-2,6-бисфосфата

Наиболее мощным аллостерическим активатором фосфофруктокиназы-1 и ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы печени является **фруктозо-2,6-бисфосфат**. Он снижает ингибирующее действие АТР на фосфофруктокиназу-1 и увеличивает сродство этого фермента к фруктозо-6-фосфату. При ингибировании фруктозо-1,6-бисфосфатазы фруктозо-2,6-бисфосфатом происходит увеличение $K_м$ для фруктозо-1,6-бисфосфата. Концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата регулируется концентрацией фруктозо-6-фосфата и гормонами (рис. 22.4). Фруктозо-2,6-бисфосфат образуется при фосфорилировании фруктозо-6-фосфата, катализируемом **фосфофруктокиназой-2**. Этот фермент является бифункциональным (он обладает также фруктозо-2,6-бисфосфатазной активностью) и находится под аллостерическим контролем фруктозо-6-фосфата (при повышении концентрации фруктозо-6-фосфата, наблюдаемой в случае избытка глюкозы, происходит стимулирование киназной и ингибирование фосфатазной активности). С другой стороны, при снижении концентрации глюкозы глюкагон стимулирует образование сАМР; последний активирует сАМР-зависимую протеинкиназу, которая в свою очередь ингибирует фосфофруктокиназу-2 и активирует фруктозо-2,6-бисфосфатазу путем фосфорилирования. Таким образом, **при избытке глюкозы увеличивается концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата, который активирует фосфофруктокиназу-1 и ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу**; в результате происходит стимулирование гликолиза. При недостатке глюкозы гликагон уменьшает концентрацию фрук-

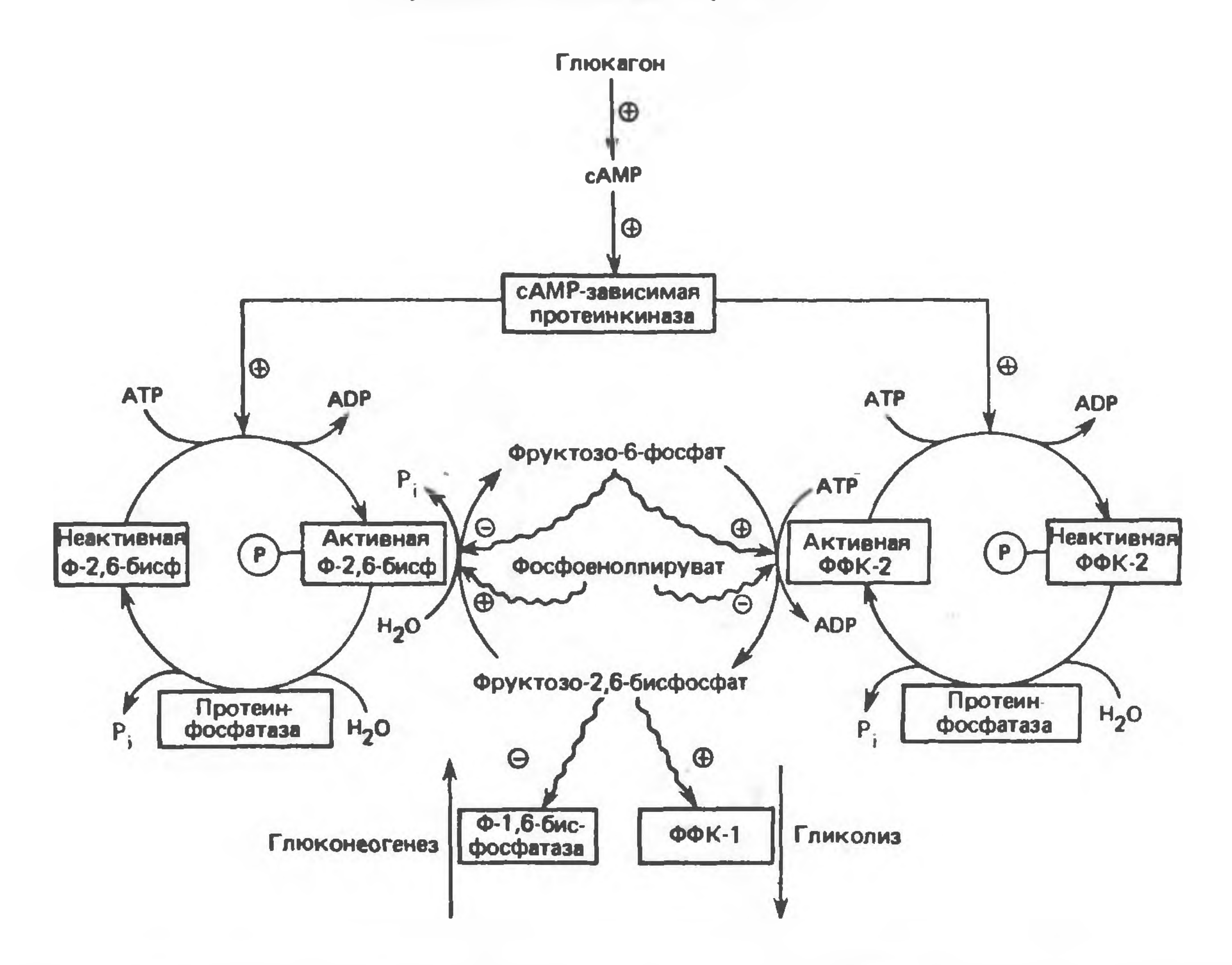


Рис. 22.4. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза в печени фруктозо-2,6-бисфосфатом. Ф-1,6-бисфосфатаза фруктозо-1,6-бисфосфатаза; Ф-2,6-бисфосфатаза фруктозо-2,6-бисфосфатаза; ФФК-1 6-фосфофрукто-1-киназа; ФФК-2 6-фосфофрукто-2-киназа. Аллостерическое действие показано волнистыми стрелками.

тозо-2,6-бисфосфата; это приводит (рис. 22.4) к снижению активности фосфофруктокиназы-1 и повышению активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы, в результате чего стимулируется глюконеогенез. Рассмотренный механизм регуляции позволяет понять, каким образом при стимулировании гликогенолиза глюкагоном происходит высвобождение глюкозы и тормозится ее превращение по гликолитическому пути.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИКОГЕНА (РИС. 22.5)

Регуляция метаболизма гликогена осуществляется путем изменения активностей **гликогенсинтазы** и **фосфорилазы** (эти активности контролируются субстратами аллостерически, а также регулируются гормонами). Повышение концентрации cAMP приводит к активации фосфорилазы под действием киназы фосфорилазы и одновременно к переходу гликогенсинтазы в неактивную форму (см. гл. 19); в обоих процессах участвует **cAMP-зависимая протеинкиназа**. Таким образом, при ингибировании гликогенолиза усиливается гликогенез, а при ингибировании последнего усиливается гликогенолиз. Важное значение для регуляции метаболизма гликогена имеет то обстоятельство, что дефосфорилирование фосфорилазы а, киназы фосфорилазы и гликогенсинтазы b катализируется одним ферментом с широкой специфичностью — протеинфосфатазой-1. В свою очередь протеинфосфатаза-1 ингибируется cAMP-зависимой протеинкиназой при участии ингибитора-1 (рис. 22.5). Таким образом, торможение гликогенолиза и стимуляция гликогенеза происходят одновременно. Это обусловлено тем, что оба процесса зависят от активности cAMP-зависимой протеинкиназы. Киназа фосфорилазы и гликогенсинтаза могут фосфорилироваться и дефосфорилироваться по нескольким «вторичным» участкам под действием различных киназ и фосфатаз. Это вторичное фосфорилирование влияет на чувствительность первичных участков к фосфорилированию и дефосфорилированию. **Фосфорилирование по нескольким участкам** наблюдается также в случае пируватдегидрогеназы.

Печень. Концентрация **фосфорилазы а** является главным фактором в регуляции метаболизма гликогена в печени. Этот фермент не только катализирует реакцию, являющуюся определяющей скорость стадией гликогенолиза, но также ингибирует активность протеинфосфатазы-1 и, таким образом, контролирует синтез гликогена (рис. 22.5). После приема пищи концентрация глюкозы в крови увеличивается, вызывая аллостерическое ингибирование фосфорилазы. 5-AMP, концентрация которого возрастает при уменьшении содержания ATP (см. выше), активирует фосфорилазу. Катехоламины, в том числе ад-

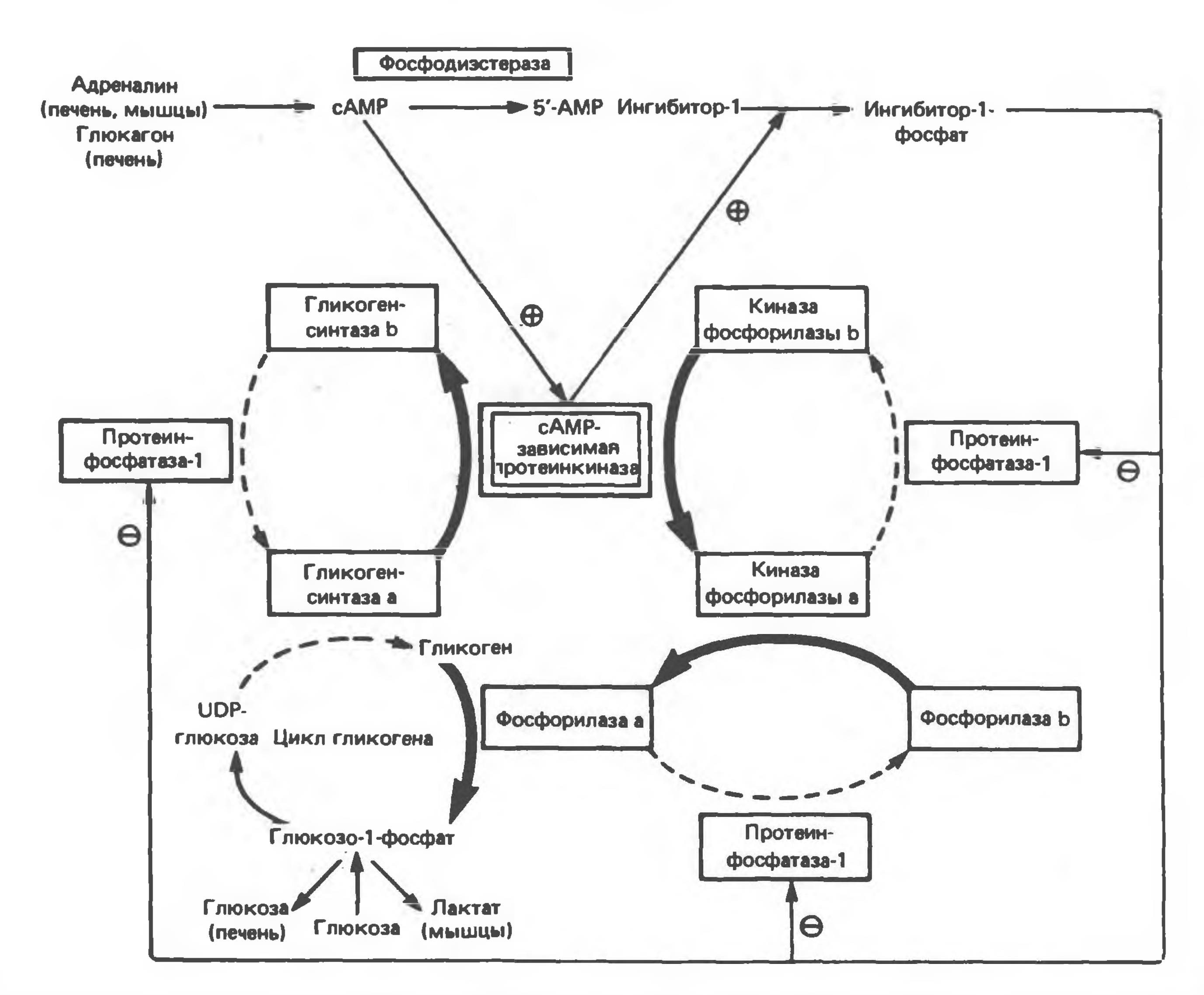


Рис. 22.5. Регуляция гликогенолиза и гликогенеза cAMP-зависимой протеинкиназой. При увеличении концентрации cAMP стимулируются реакции, ведущие к запуску гликогенолиза (они показаны жирными стрелками), и ингибируются реакции, ведущие к его торможению (показаны пунктирными стрелками). При уменьшении концентрации cAMP под действием фосфодиэстеразы возникает противоположная ситуация и в итоге стимулируется гликогенез

реналин, стимулируют гликогенолиз по механизму, функционирующему при участии α_1-адренорецепторов и не требующему участия cAMP. В этом случае стимуляция осуществляется путем прямой активации киназы фосфорилазы b ионами Ca^{2+} и кальмодулином. Вазопрессин, окситоцин и ангиотензин II также вызывают cAMP-независимый гликогенолиз при участии ионов кальция или продукта гидролиза фосфатидилинозитолбисфосфата. Введение инсулина вызывает быструю инактивацию фосфорилазы и последующую активацию гликогенсинтазы; для действия инсулина необходимо присутствие глюкозы.

Действие ветвящих и деветвящих ферментов не регулируется.

Значение «холостых» субстратных циклов

На многих регуляторных стадиях гликолиза и метаболизма гликогена могут осуществляться циклические процессы фосфорилирования и дефосфорилирования в результате функционирования соответствующих ферментов, например: глюкокиназы/глюкозо-6-фосфатазы; фосфофруктокиназы-1/фруктозо-1,6-бисфосфатазы; пируваткиназы/пируваткарбоксилазы / фосфоенолпируваткарбоксикиназы; гликогенсинтазы/фосфорилазы. Если бы эти циклы функционировали неконтролируемо, они пополнили бы число холостых циклов, единственным результатом которых является гидролиз ATP. То, что этого не происходит, объясняется наличием различных регуляторных механизмов, обеспечивающих такую работу цикла, при которой один из ферментов цикла ингибируется, а другой активируется в соответствии с нуждами отдельных тканей или организма в целом. Однако периодическое функционирование некоторых циклов может иметь определенное физиологическое значение. Например, цикл, катализируемый глюкокиназой и глюкозо-6-фосфатазой, находится на таком участке метаболизма глюкозы, который может регулировать поток метаболитов при высокой скорости поступления субстратов.

РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ (СМ. РИС. 18.3)

Едва ли можно сомневаться в том, что в большинстве тканей, в которых основная функция цикла лимонной кислоты — обеспечение энергией, **дыхательный контроль**, осуществляемый при функционировании дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, является определяющим фактором при регуляции активности рассматриваемого цикла. Активность этого цикла непосредственно связана с поступлением окисленных кофакторов дегидрогеназ (например, NAD), которое в свою очередь зависит от доступности ADP и, в конечном счете, от скорости потребления ATP. Свойства ряда ферментов этого цикла указывают на то, что кроме общей регуляции существует также регуляция на уровне самого цикла. В клетках головного мозга, в которых ацетил-CoA образуется в основном из углеводов, регуляция цикла лимонной кислоты может происходить на стадии, катализируемой пируватдегидрогеназой. В самом цикле регуляция может осуществляться путем аллостерического ингибирования цитратсинтазы при действии ATP или ацил-CoA-производных длинноцепочечных жирных кислот. Митохондриальная NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа аллостерически активируется ADP и ингибируется ATP и NADH. α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс регулируется, по-видимому, аналогично пируватдегидрогеназе. Сукцинатдегидрогеназа ингибируется оксалоацетатом, а образование оксалоацетата в малатдегидрогеназной реакции зависит от соотношения [NADH]/[NAD^+]. Поскольку величина $K_м$ цитратсинтазы для оксалоацетата такого же порядка, что и величина внутримитохондриальной концентрации оксалоацетата, концентрация последнего, по-видимому, играет определенную роль в регуляции скорости образования цитрата. Какие из вышеперечисленных механизмов регуляции в самом цикле функционируют in vivo, пока еще не ясно.

РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Источники глюкозы крови

А. Углеводы, содержащиеся в пищевом рационе. Большинство углеводов, поступающих в организм с пищей, гидролизуется с образованием глюкозы, галактозы или фруктозы, которые через **воротную вену** поступают в печень. Галактоза и фруктоза быстро превращаются в печени в глюкозу (см. рис. 21.2 и 21.3).

Б. Различные глюкозообразующие соединения, вступающие на путь глюконеогенеза (рис. 22.2). Эти соединения можно разделить на две группы: (1) соединения, превращающиеся в глюкозу и не являющиеся продуктами ее метаболизма, например **аминокислоты и пропионат**; (2) соединения, которые являются продуктами частичного метаболизма глюкозы в ряде тканей; они переносятся в печень и почки, где из них ресинтезируется глюкоза. Так, **лактат**, образующийся в скелетных мышцах и эритроцитах из глюкозы, транспортируется в печень и почки, где из него вновь образуется глюкоза, которая затем поступает в кровь и ткани. Этот процесс называется **циклом Кори** или циклом молочной кислоты (рис. 22.6). Источником **глицерола**, необходимого для синтеза триацилглицеролов в жировой ткани, является глюкоза крови, поскольку использование свободного глицерола в этой ткани затруднено. Ацилглицеролы жировой ткани подвергаются постоянному гид-

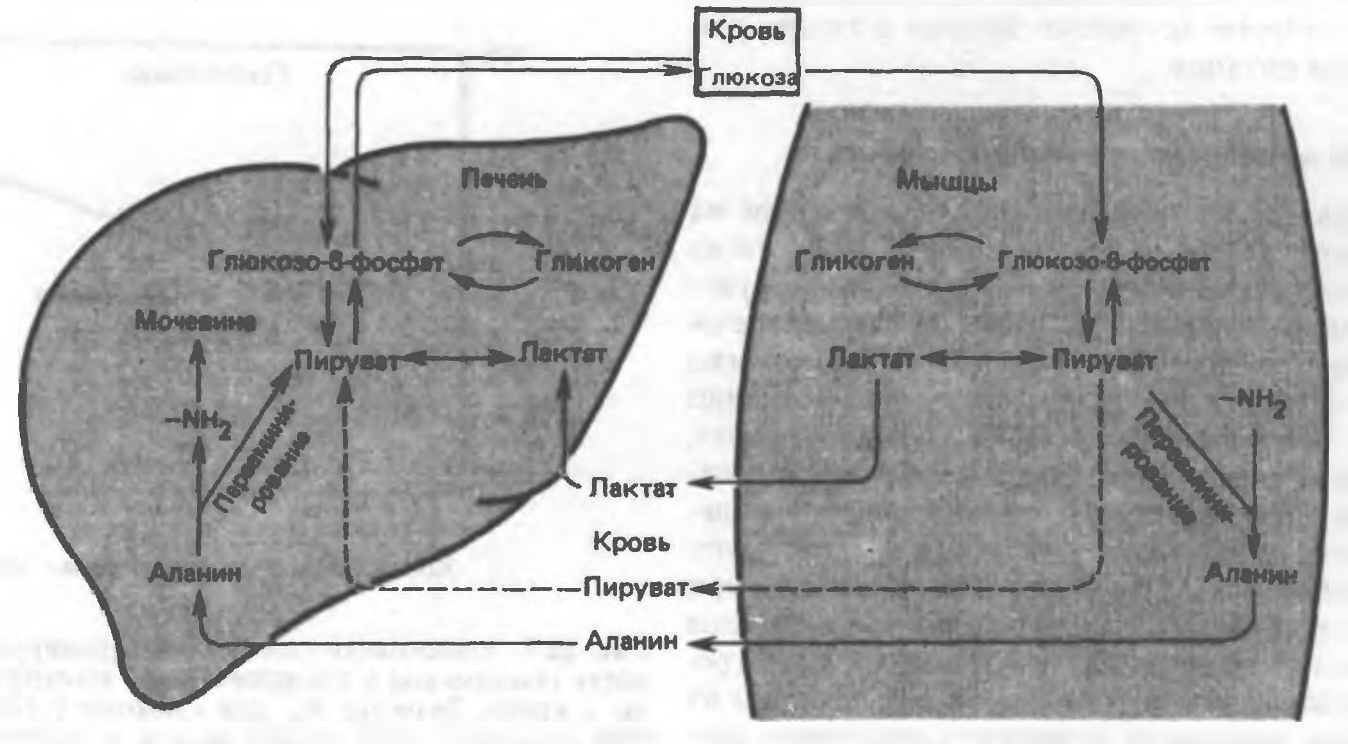


Рис. 22.6. Цикл молочной кислоты (цикл Кори) и глюкозо-аланиновый цикл.

ролизу, в результате которого образуется свободный глицерол, который диффундирует из ткани в кровь. В печени и почках он вступает на путь глюконеогенеза и вновь превращается в глюкозу. Таким образом, постоянно функционирует цикл, в котором глюкоза из печени и почек транспортируется в жировую ткань, а глицерол из этой ткани поступает в печень и почки, где превращается в глюкозу.

Следует отметить, что среди аминокислот, транспортируемых при голодании из мышц в печень, преобладает аланин. Это позволило постулировать существование **глюкозоаланинового цикла** (рис. 22.6), по которому глюкоза поступает из печени в мышцы, а аланин — из мышц в печень, за счет чего обеспечивается перенос аминоазота из мышц в печень и «свободной энергии» из печени в мышцы. Энергия, необходимая для синтеза глюкозы из пирувата в печени, поступает за счет окисления жирных кислот.

В. Гликоген печени.

Концентрация глюкозы в крови

У человека в период между приемами пищи концентрация глюкозы в крови варьирует от 80 до 100 мг/100 мл. После приема пищи, богатой углеводами, концентрация глюкозы увеличивается до 120—130 мг/100 мл. Во время голодания концентрация глюкозы падает приблизительно до 60—70 мг/100 мл. При нормальном состоянии организма уровень глюкозы в крови колеблется в указанных пределах. У жвачных концентрация глюкозы значительно ниже — около 40 мг/100 мл у овец и 60 мг/100 мл у крупного рогатого скота. Это, по-видимому, связано с тем, что у данных животных практически все углеводы, поступающие с пищей, расщепляются до низших (летучих) жирных кислот, которые заменяют глюкозу в качестве источника энергии в тканях при нормальном питании.

Регуляция концентрации глюкозы в крови

Поддержание содержания глюкозы в крови на определенном уровне является примером одного из самых совершенных механизмов гомеостаза, в функционировании которого участвуют печень, внепеченочные ткани и некоторые гормоны. Глюкоза легко проникает в клетки печени и относительно медленно в клетки внепеченочных тканей. Следовательно, прохождение через клеточную мембрану является лимитирующей скорость стадией при потреблении глюкозы внепеченочными тканями. Поступившая в клетки глюкоза быстро фосфорилируется при действии гексокиназы. С другой стороны, вполне возможно, что более значительное влияние на потребление глюкозы печенью или на выход глюкозы из этого органа оказывают активность некоторых других ферментов и концентрации ключевых промежуточных продуктов. Тем не менее концентрация глюкозы в крови является важным фактором, регулирующим скорость потребления глюкозы как печенью, так и внепеченочными тканями.

Роль глюкокиназы. Следует особо отметить, что глюкозо-6-фосфат ингибирует гексокиназу и, следовательно, потребление глюкозы внепеченочными тканями, зависящее от гексокиназы, которая катализирует фосфорилирование глюкозы и регулируется по принципу обратной связи. С печенью этого не происходит, поскольку глюкозо-6-фосфат не ингибирует глюкокиназу. Этот фермент характеризуется более высоким значением $K_м$ (более низким сродством) для глюкозы, чем гексокиназа; активность глюкокиназы повышается в пределах физиологических концентраций глюкозы (рис. 22.7); после приема богатой углеводами пищи фермент «настраивается» на высокие концентрации глюкозы, поступающей в печень по воротной вене. Отметим, что этот фермент отсутствует у жвачных, у которых лишь небольшое количество глюкозы поступает из кишечника в систему воротной вены.

При нормальном содержании глюкозы в крови (80—100 мг/100 мл) печень, по-видимому, поставляет глюкозу в кровь. При увеличении же уровня глюкозы в крови ее выход из печени прекращается, а при достаточно высоких концентрациях начинается поступление глюкозы в печень. Как показали опыты, проведенные на крысах, при концентрации глюкозы в воротной вене печени 150 мг/100 мл скорость поступления глюкозы в печень и скорость ее выхода из печени равны.

Роль инсулина. В состоянии гипергликемии увеличивается поступление глюкозы как в печень, так и в периферические ткани. Центральную роль в регуляции концентрации глюкозы в крови играет гормон

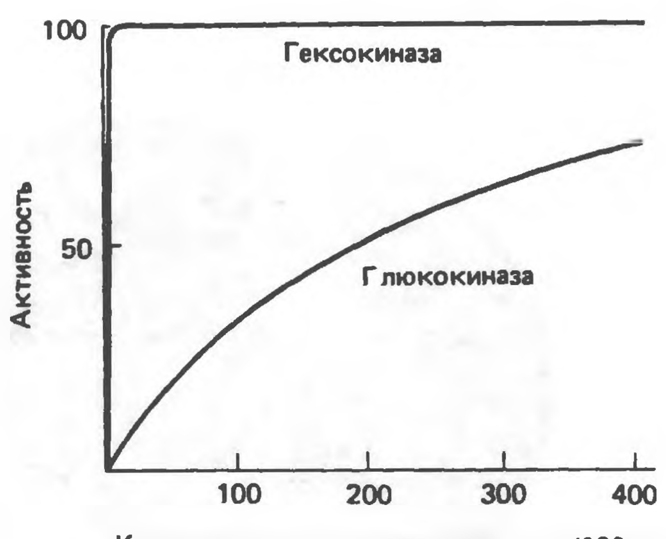


Рис. 22.7. Зависимость глюкозофосфорилирующей активности гексокиназы и глюкокиназы от концетрации глюкозы в крови. Значение K_M для глюкозы у гексокиназы — 0,05 ммоль·л$^{-1}$ (0,9 мг/100 мл), а у глюкокиназы — 10 ммоль·л$^{-1}$ (180 мг/100 мл).

инсулин. Он синтезируется в поджелудочной железе В-клетками островков Лангерганса, и его поступление в кровь увеличивается при гипергликемии. Концентрация этого гормона в крови изменяется параллельно концентрации глюкозы; введение его быстро вызывает гипогликемию. К веществам, вызывающим секрецию инсулина, относятся аминокислоты, свободные жирные кислоты, кетоновые тела, глюкагон, секретин и лекарственный препарат толбутамид; адреналин и норадреналин, наоборот, блокируют его секрецию. Инсулин быстро вызывает увеличение поглощения глюкозы жировой тканью и мышцами за счет ускорения транспорта глюкозы через клеточные мембраны путем перемещения переносчиков глюкозы из цитоплазмы в плазматическую мембрану. Однако инсулин не оказывает прямого действия на проникновение глюкозы в клетки печени; это согласуется с данными о том, что скорость метаболизма глюкозы клетками печени не лимитируется скоростью ее прохождения через клеточные мембраны. Инсулин, однако, действует опосредованно, влияя на активность ферментов, участвующих в гликолизе и гликогенолизе (см. выше).

Передняя доля гипофиза секретирует гормоны, действие которых противоположно действию инсулина, т. е. они повышают уровень глюкозы в крови. К ним относятся гормон роста, АКТГ (кортикотропин) и, вероятно, другие «диабетогенные» факторы. Гипогликемия стимулирует секрецию гормона роста. Он вызывает уменьшение поступления глюкозы в некоторые ткани, например в мышцы. Действие гормона роста является до некоторой степени опосредованным, поскольку он стимулирует мобилизацию из жировой ткани свободных жирных кислот, которые являются ингибиторами потребления глюкозы. Длительное введение гормона роста приводит к диабету. Вызывая гипергликемию, он стимулирует постоянную секрецию инсулина, что в конечном счете приводит к истощению В-клеток.

Глюкокортикоиды (11-гидроксистероиды) секретируются корой надпочечников и играют важную роль в углеводном обмене. Введение этих стероидов усиливает глюконеогенез за счет интенсификации катаболизма белков в тканях, увеличения потребления аминокислот печенью, а также повышения активности трансаминаз и других ферментов, участвующих в процессе глюконеогенеза в печени. Кроме того, глюкокортикоиды **ингибируют утилизацию глюкозы во внепеченочных тканях**. В рассмотренных случаях глюкокортикоиды действуют подобно **антагонистам инсулина**.

Адреналин секретируется мозговым слоем надпочечников в ответ на стрессорные стимулы (страх, сильное волнение, кровотечение, кислородная недостаточность, гипогликемия и т. д.). Стимулируя фосфорилазу, он вызывает гликогенолиз в печени и мышцах. В мышцах из-за отсутствия глюкозо-6-фосфатазы гликогенолиз доходит до стадии лактата, в то время как в печени основным продуктом превращения гликогена является глюкоза, которая поступает в кровь, где уровень ее повышается.

Глюкагон является гормоном, секретируемым А-клетками островков Лангерганса в поджелудочной железе (его секреция стимулируется гипогликемией). Когда по воротной вене глюкагон поступает в печень, он, подобно адреналину, активирует фосфорилазу и вызывает гликогенолиз. Большая часть эндогенного глюкагона задерживается в печени. В отличие от адреналина глюкагон не влияет на фосфорилазу мышц. Этот гормон усиливает также глюконеогенез из аминокислот и лактата. **Гипергликемический** эффект глюкагона обусловлен как гликогенолизом, так и глюконеогенезом в печени.

Следует отметить, что **гормон щитовидной железы** также влияет на содержание глюкозы в крови. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что тироксин обладает диабетогенным действием, а удаление щитовидной железы препятствует развитию диабета. Было отмечено, что гликоген полностью отсутствует в печени животных с тиреотоксикозом. У людей с усиленной функцией щитовидной железы содержание сахара в крови при голодании повышено, а у людей с пониженной функцией щитовидной железы оно снижено. При гипертиреозе глюкоза, по-видимому, расходуется с нормальной или повышенной скоростью, а при гипотиреозе способность утилизировать глюкозу понижена. Следует отметить, что пациенты с гипофункцией щитовидной железы менее чувствительны к действию инсулина, чем здоровые люди и пациенты с гипертиреозом.

Почечный порог для глюкозы, глюкозурия

Когда содержание глюкозы в крови достигает относительно высокого уровня, в процесс регуляции включаются и почки. Глюкоза фильтруется почечными клубочками и обычно полностью возвращается в кровь в результате реабсорбции (обратного всасывания) в почечных канальцах. Процесс реабсорбции глюкозы связан с расходованием АТР в клетках почечных канальцев. Максимальная скорость реабсорбции глюкозы в почечных канальцах около 350 мг·мин$^{-1}$. При повышенном содержании глюкозы в крови клубочковый фильтрат содержит больше глюкозы, чем может быть реабсорбировано в канальцах. Избыток глюкозы выводится с мочой, т. е. возникает гликозурия. У здоровых людей гликозурия наблюдается в том случае, если содержание глюкозы в венозной крови превышает 170—180 мг/100 мл; этот уровень называют почечным порогом для глюкозы.

У подопытных животных можно вызвать гликозурию с помощью **флоридзина**, ингибирующего ре-

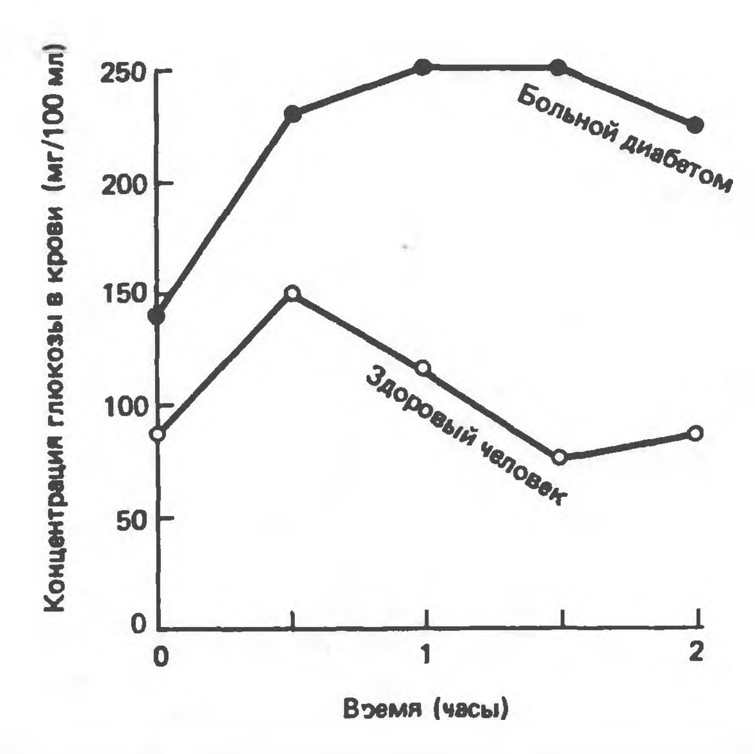


Рис. 22.8. Проба на толерантность к глюкозе. Кривые содержания глюкозы в крови у здорового и больного диабетом человека после приема 50 г глюкозы. Обратите внимание на то, что у больного диабетом исходное содержание глюкозы в крови повышено. Показателем нормальной толерантности является возвращение к исходному уровню глюкозы в крови в течение двух часов.

абсорбцию глюкозы в почечных канальцах. Такую гликозурию, обусловленную нарушением реабсорбции глюкозы, называют почечной гликозурией. Причиной почечной гликозурии может быть наследственный дефект почек, или же она может развиться в результате ряда заболеваний. Гликозурия часто является указанием на заболевание **сахарным диабетом**.

Толерантность к глюкозе

О способности организма использовать глюкозу можно судить по его толерантности к ней. После введения определенного количества глюкозы строят кривые динамики содержания глюкозы в крови (рис. 22.8), которые характеризуют толерантность к глюкозе. При **сахарном диабете** она понижена из-за уменьшения количества секретируемого инсулина; при этом заболевании содержание глюкозы в крови повышается (гипергликемия), возникает гликозурия, могут происходить изменения в обмене жиров. Толерантность к глюкозе снижается не только при диабете, но и при некоторых состояниях, сопровождающихся нарушением функции печени, при ряде инфекционных заболеваний, ожирении, действии ряда лекарственных препаратов, а иногда и при атеросклерозе. Снижение толерантности к глюкозе может также наблюдаться при гиперфункции гипофиза или коры надпочечников вследствие антагонизма между гормонами, секретируемыми этими железами внутренней секреции, и инсулином.

Инсулин повышает толерантность организма к глюкозе. При его введении содержание глюкозы в крови снижается, а ее потребление и содержание в виде гликогена в печени и мышцах увеличиваются. При введении избытка инсулина может возникнуть тяжелая **гипогликемия**, сопровождающаяся судорогами; если в этом состоянии быстро не ввести глюкозу, то может наступить летальный исход. У человека гипогликемические судороги появляются при быстром снижении содержания глюкозы в крови до 20 мг/100 мл. Повышенная толерантность к глюкозе наблюдается при недостаточной функции гипофиза или коры надпочечников; это является следствием снижения антагонистического эффекта гормонов, секретируемых этими железами, по отношению к инсулину. В результате «относительное содержание» инсулина в организме увеличивается.

ЛИТЕРАТУРА

Cohen P. Control of Enzyme Activity, 2nd ed. Chapman and Hall, 1983.

Hers H. G. The control of glycogen metabolism in the liver, Annu. Rev. Biochem., 1976, **45**, 167.

Hers H. G., Hue L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Annu. Rev. Biochem., 1983, **52**, 617.

Hers H. G., Van Schaftingen E. Fructose 2-6-bisphosphate two years after its discovery, Biochem. J., 1982, **206**, 1.

Hue L., Van de Werve G. (eds). Short-Term Regulation of Liver Metabolism, Elsevier/North Holland, 1981.

Newsholme E. A., Crabtree B. Flux-generating and regulatory steps in metabolic control, Trends Biochem. Sci., 1981, **6**, 53.

Newsholme E. A., Start C. Regulation in Metabolism. Wiley, 1973.

Storey K. B. A re-evalution of the Pasteur effect, Mol. Physiol., 1985, **8**, 439.

Глава 23

Окисление и биосинтез жирных кислот

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Жирные кислоты окисляются до ацетил-СоА и в то же время образуются из этого соединения. Хотя исходное вещество одного процесса идентично конечному продукту другого и химические стадии этих двух процессов сопоставимы, биосинтез жирных кислот отнюдь не является обращением процесса их окисления. Окисление жирных кислот происходит в митохондриях. Каждая стадия катализируется определенным ферментом и протекает с участием производного — ацил-СоА, в процессе участвуют коферменты NAD и FAD; в результате окисления жирных кислот образуется АТР. Биосинтез же жирных кислот (липогенез) протекает в цитозоле, в нем участвуют ацил-производные, постоянно связанные с полиферментным комплексом, в качестве кофермента функционирует NADP; для процесса необходимы АТР и ионы бикарбоната.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Протекание процессов окисления и биосинтеза жирных кислот в различных компартментах позволяет избирательно контролировать каждый процесс в соответствии с потребностями ткани. При голодании и сахарном диабете окисление жирных кислот протекает более интенсивно, в результате чего в печени происходит образование кетоновых тел (кетоз). Кетоновые тела имеют кислотную природу, поэтому при их избыточном образовании в течение длительного времени, как, например, при сахарном диабете, развивается кетоацидоз, который в конечном итоге может привести к летальному исходу. Поскольку глюконеогенез зависит от окисления жирных кислот, нарушения последнего, вызванные различными причинами, приводят к гипогликемии; она возникает, в частности, при недостатке карнитина или снижении активности ферментов, участвующих в процессе окисления жирных кислот, например карнитин-пальмитоилтрансферазы, а также при ингибировании окисления жирных кислот ядами, например гипоглицином. Первостепенное значение биосинтеза жирных кислот заключается в трансформации избытка углеводов, поступивших в организм, и аккумулировании их энергии либо на непродолжительное время (для использования в период между приемами пищи), либо на более длительный срок. Жирные кислоты сохраняются в жировой ткани в составе триацилглицеролов.

ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Свободные жирные кислоты

«Свободными жирными кислотами» (СЖК) называют жирные кислоты, находящиеся в неэстерифицированной форме; иногда их называют неэстерифицированными жирными кислотами (НЖК). В плазме крови длинноцепочечные СЖК образуют комплекс с **альбумином**, а в клетке — с **белком, связывающим жирные кислоты**, который называют Z-белком; фактически они никогда не бывают свободными. Короткоцепочечные жирные кислоты лучше растворяются в воде и находятся либо в виде неионизированной кислоты, либо в виде аниона жирной кислоты.

Активация жирных кислот

Так же как и в случае метаболизма глюкозы, жирная кислота прежде всего должна превратиться в активное производное в результате реакции, протекающей с участием АТР, и только после этого она способна взаимодействовать с ферментами, катализирующими дальнейшее превращение. В процессе окисления жирных кислот эта стадия является единственной, требующей энергии в виде АТР. В присутствии АТР и кофермента А фермент **ацил-СоА-синтетаза (тиокиназа)** катализирует превращение свободной жирной кислоты в «активную жирную кислоту» или ацил-СоА, которое осуществляется за счет расщепления одной богатой энергией фосфатной связи.

8 1573

$$\text{Жирная кислота} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow{\text{Ацил-CoA-синтетаза}} \text{Ацил-CoA} + PP_i + \text{AMP}$$

Присутствие **неорганической пирофосфатазы**, которая расщепляет богатую энергией фосфатную связь в пирофосфате, обеспечивает полноту протекания процесса активации. Таким образом, для активации одной молекулы жирной кислоты в итоге расходуются две богатые энергией фосфатные связи.

$$PP_i + H_2O \xrightarrow{\text{неорганическая пирофосфатаза}} 2P_i$$

Ацил-CoA-синтетазы находятся в эндоплазматическом ретикулуме, а также внутри митохондрий и на их наружной мембране. В литературе описан ряд ацил-CoA-синтетаз; они специфичны к жирным кислотам с определенной длиной цепи.

Роль карнитина в окислении жирных кислот

Карнитин (γ-триметиламино-β-гидроксибутират) — $(CH_3)_3N^+—CH_2—CH(OH)—CH_2—COO^-$ — является широко распространенным соединением,

$$\text{Ацил-CoA} + \text{Карнитин} \xleftrightarrow{\text{Карнитин пальмитоилтрансфераза}} \text{Ацилкарнитин} + \text{CoA}$$

особенно много его в мышцах. Он образуется из лизина и метионина в печени и почках. Активация низших жирных кислот и их окисление могут происходить в митохондриях независимо от карнитина, однако длинноцепочечные ацил-CoA-производные (или СЖК) **не могут проникать в митохондрии** и окисляться, если предварительно не образуют ацилкарнитин-производных. На наружной стороне внутренней мембраны митохондрий имеется **фермент карнитин-пальмитоилтрансфераза I**, который переносит длинноцепочечные ацильные группы на карнитин с образованием ацилкарнитина; последний способен проникать в митохондрии, где находятся ферменты, катализирующие процесс β-окисления.

Возможный механизм, объясняющий участие карнитина в окислении жирных кислот в митохондриях, приведен на рис. 23.1. Кроме того, в митохондриях находится другой фермент — **карнитин-ацетилтрансфераза**, который катализирует перенос короткоцепочечных ацильных групп между CoA и карнитином. Функция этого фермента пока не ясна. Возможно,

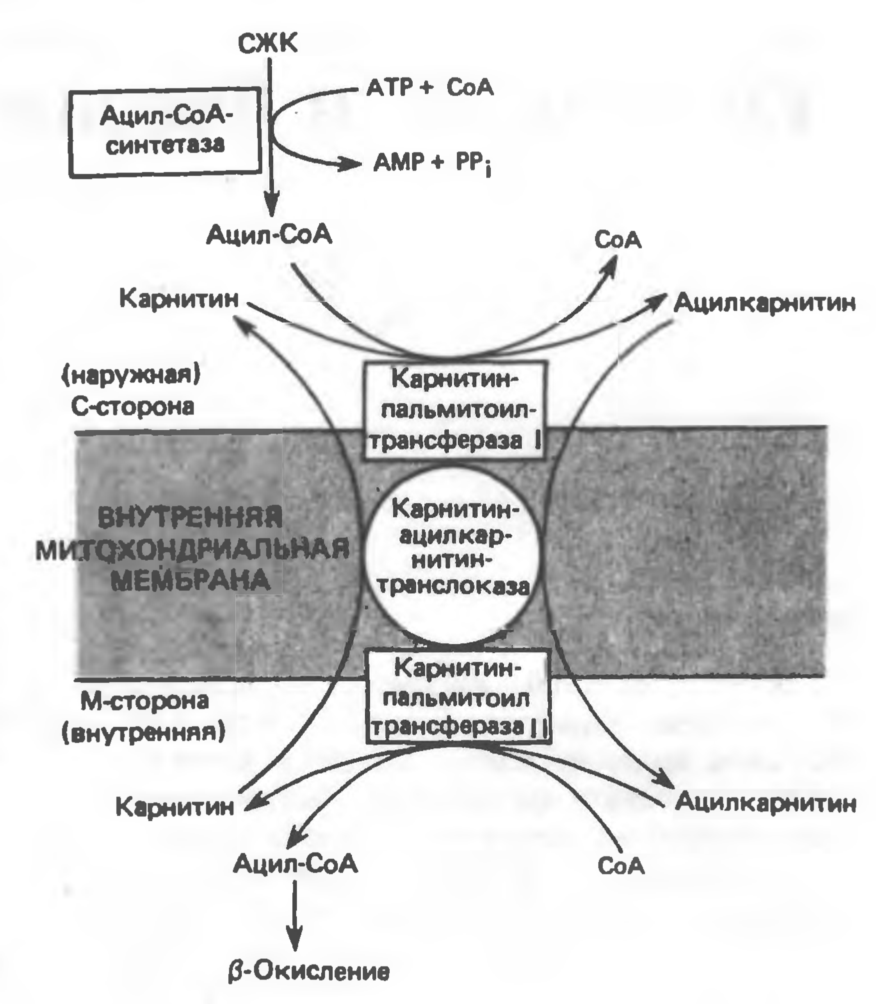
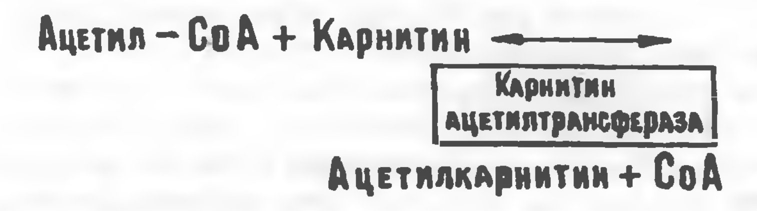


Рис. 23.1. Роль карнитина в переносе длинноцепочечных жирных кислот через внутреннюю мембрану митохондрий. Длинноцепочечный ацил-CoA не способен проходить через внутреннюю мембрану митохондрий, в то время как такой способностью обладает ацилкарнитин, образующийся при действии карнитин-пальмитоилтрансферазы I. Карнитин-ацилкарнитин-транслоказа является транспортной системой, осуществляющей перенос молекулы ацилкарнитина через внутреннюю мембрану митохондрии, сопряженный с выходом молекулы свободного карнитина. Затем при действии карнитин-пальмитоилтрансферазы II, локализованной на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрии, ацилкарнитин взаимодействует с CoA. В результате в митохондриальном матриксе вновь образуется ацил-CoA, а карнитин высвобождается.



он облегчает транспорт ацетильных групп через мембрану митохондрий.

β-Окисление жирных кислот

Общее представление дает рис. 23.2. При β-окислении жирных кислот 2 атома углерода одновременно отщепляются от карбоксильного конца молекулы ацил-CoA. Углеродная цепь разрывается ме-

H_3C ... CO~S-CoA
Пальмитоил-CoA
α, β

CO~S-CoA + CH_3-CO~S-CoA
Ацетил-CoA

Последовательное отщепление 2С-фрагментов

8 CH_3-CO~S-CoA
Ацетил-CoA

Рис. 23.2. Схема β-окисления жирных кислот.

жду атомами углерода в положениях α(2) и β(3), откуда и возникло название β-окисление. Образующиеся двухуглеродные фрагменты представляют собой ацетил-CoA. Так, в случае пальмитоил-CoA образуется 8 молекул ацетил-CoA.

Последовательность реакций

Ряд ферментов, известных под общим названием «оксидазы жирных кислот», находятся в митохондриальном матриксе в непосредственной близости от дыхательной цепи, локализованной во внутренней мембране митохондрий. Эта система катализирует окисление ацил-CoA до ацетил-CoA, которое сопряжено с фосфорилированием ADP до ATP (рис. 23.3).

После проникновения ацильного фрагмента через мембрану митохондрий при участии карнитиновой транспортной системы и переноса ацильной группы от карнитина на CoA происходит отщепление двух атомов водорода от углеродных атомов в положениях 2(α) и 3(β), катализируемое **ацил-CoA-дегидрогеназой**. Продуктом этой реакции является Δ^2-*транс*-еноил-CoA. Фермент представляет собой флавопротеин, его простетической группой служит FAD. Окисление последнего в дыхательной цепи митохондрий происходит при участии другого флавопротеина, названного **электронпереносящим флавопротеином** (см. с. 123). Далее происходит гидратация двойной связи, в результате чего образуется 3-гидроксиацил-CoA. Эта реакция катализируется ферментом **Δ^2-еноил-CoA-гидратазой**. Затем 3-гидроксиацил-CoA дегидрируется по 3-му атому углерода с образованием 3-кетоацил-CoA; эта реакция катализируется **3-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназой** при участии в качестве кофермента NAD. 3-Кетоацил-CoA расщепляется между вторым и третьим атомами углерода **3-кетотиолазой** или **ацетил-CoA-ацилтрансферазой** с образованием ацетил-CoA- и ацил-CoA-производного, которое на 2 атома углерода короче исходной молекулы ацил-CoA. Это тиолитическое расщепление требует участия еще одной молекулы CoA. Образующийся укороченный ацил-CoA вновь вступает в цикл β-окисления, начиная с реакции 2 (рис. 23.3). Таким путем длинноцепочечные жирные кислоты могут полностью расщепляться до ацетил-CoA (C_2-фрагментов); последние в цикле лимонной кислоты, который протекает в митохондриях, окисляются до CO_2 и H_2O.

Окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода

β-Окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода заканчивается на стадии образования трехуглеродного фрагмента — пропионил-CoA, который затем превращается в сукцинил-CoA, являющийся интермедиатом цикла лимонной кислоты (см. также рис. 20.2).

Энергетика процесса окисления жирных кислот

В результате переноса электронов по дыхательной цепи от восстановленного флавопротеина и NAD синтезируется по 5 богатых энергией фосфатных связей (см. гл. 13) на каждые 7 (из 8) молекул ацетил-CoA, образующихся при β-окислении пальмитиновой кислоты (7 × 5 = 35). Всего образуется 8 молекул ацетил-CoA, и каждая из них, проходя через цикл лимонной кислоты, обеспечивает синтез 12 богатых энергией связей. Всего в расчете на молекулу пальмитата по этому пути генерируется 8 × 12 = 96 богатых энергией фосфатных связей. Если учесть две связи, необходимые для активации

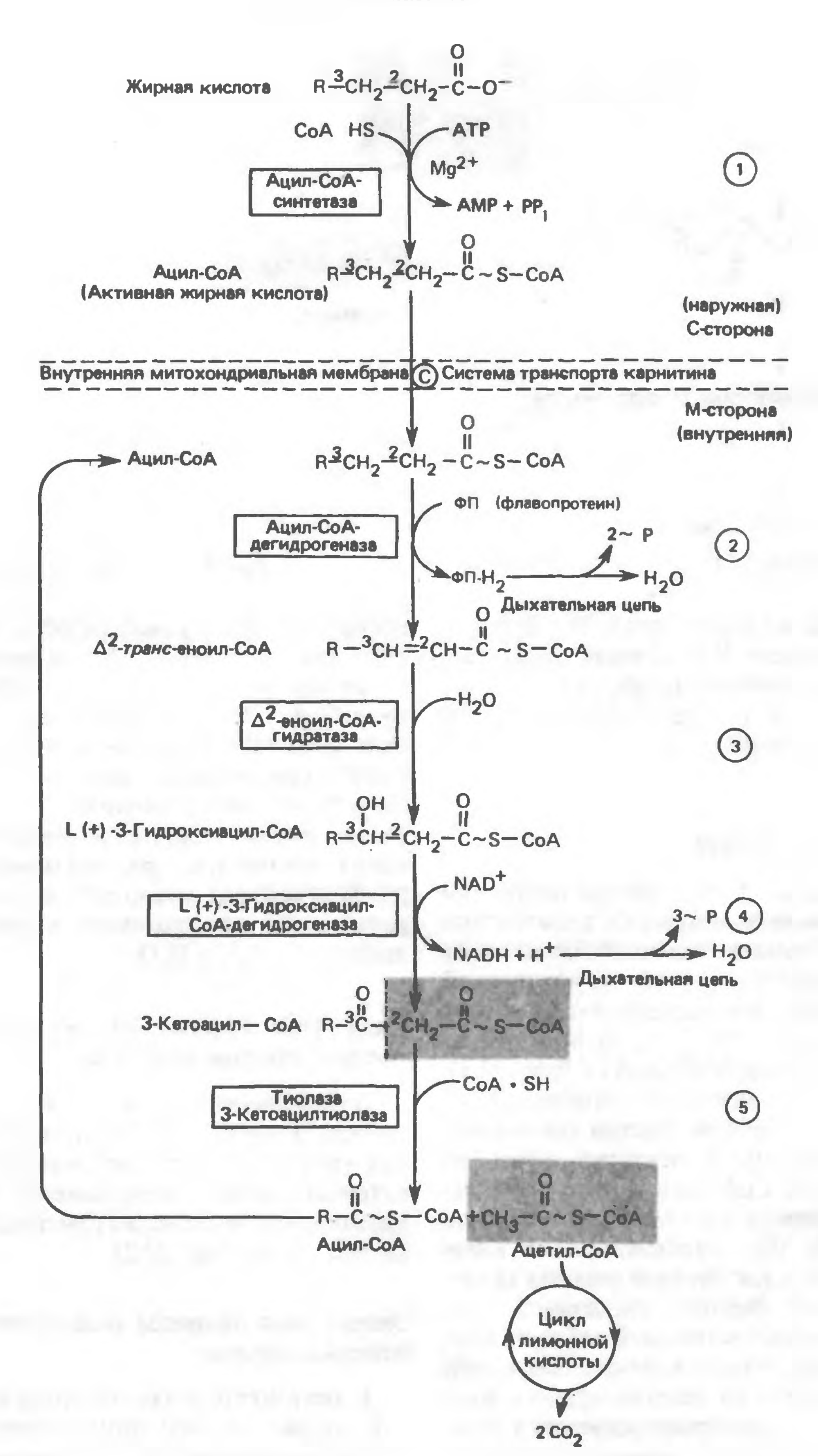


Рис. 23.3. β-Окисление жирных кислот. Длинноцепочечный ацил-CoA последовательно укорачивается, проходя цикл за циклом ферментативные реакции 2—5; в результате каждого цикла происходит отщепление ацетил-CoA, катализируемое тиолазой (реакция 5). Когда остается четырехуглеродный ацильный радикал, то из него в результате реакции 5 образуются две молекулы ацетил-CoA.

жирной кислоты, то в общей сложности получим 129 богатых энергией связей на 1 моль или 129 × 30,5 = 3935 кДж. Поскольку свободная энергия сгорания пальмитиновой кислоты составляет 9791 кДж/моль, то на долю энергии, запасаемой в виде фосфатных связей при окислении жирной кислоты, приходится около 40%.

Окисление жирных кислот в пероксисомах

В пероксисомах β-окисление жирных кислот происходит в модифицированном виде. Продуктами окисления в данном случае являются ацетил-СоА и H_2O_2, последняя образуется на стадии, катализируемой связанной с флавопротеином дегидрогеназой. Этот путь окисления непосредственно не сопряжен с фосфорилированием и образованием АТР, но он обеспечивает расщепление жирных кислот с очень длинной цепью (например, C_{20}, C_{22}); он включается при диете, богатой жирами, или приеме гиполипидемических лекарственных препаратов, таких, как клофибрат. Ферменты пероксисом не атакуют жирные кислоты с короткими цепями, и процесс β-окисления останавливается при образовании октаноил-СоА. Октаноильные и ацетильные группы удаляются затем из пероксисом в виде октаноилкарнитина и ацетилкарнитина и окисляются в митохондриях.

α- и ω-Окисление жирных кислот

β-Окисление является основным путем катаболизма жирных кислот. Однако недавно было обнаружено, что в тканях мозга происходит α-окисление жирных кислот, т. е. последовательное отщепление одноуглеродных фрагментов от карбоксильного конца молекулы. В этом процессе участвуют интермедиаты, содержащие СоА; он не сопровождается образованием богатых энергией фосфатных связей.

ω-Окисление жирных кислот в норме весьма незначительно. Этот тип окисления, катализируемый гидроксилазами при участии цитохрома Р-450 (см. с. 123), протекает в эндоплазматическом ретикулуме. —CH_3-Группа превращается в —CH_2OH-группу, которая затем окисляется до —СООН; в результате образуется дикарбоновая кислота. Последняя расщепляется путем β-окисления обычно до адипиновой (C_6) и субериновой (C_8) кислот, которые затем удаляются с мочой.

Клинические аспекты

Кетоз развивается при высокой скорости окисления жирных кислот в печени, особенно в тех случаях, когда оно происходит на фоне недостатка углеводов (см. с. 292). Подобное состояние возникает при приеме **пищи, богатой жирами, голодании, сахарном диабете, кетозе у лактирующих коров и токсикозе беременности** (кетозе) у овец. Ниже приводятся причины, вызывающие нарушение процесса окисления жирных кислот.

Недостаток карнитина встречается у новорожденных, чаще всего недоношенных детей; он обусловлен либо нарушением биосинтеза карнитина, либо его «утечкой» в почках. Потери карнитина могут происходить при гемодиализе; больные, страдающие органической ацидурией, теряют большое количество карнитина, который экскретируется из организма в форме конъюгатов с органическими кислотами. Для восполнения потерь этого соединения некоторые пациенты нуждаются в особой диете, включающей продукты, содержащие карнитин. Признаками и симптомами недостатка карнитина являются приступы гипогликемии, возникающие из-за снижения глюконеогенеза в результате нарушения процесса окисления жирных кислот, уменьшение образования кетоновых тел, сопровождающееся повышением содержания СЖК в плазме крови, мышечная слабость (миастения), а также накопление липидов. При лечении внутрь принимают препарат карнитина. Симптомы недостатка карнитина очень сходны с симптомами синдрома Рейе (Reye), при котором, однако, содержание карнитина является нормальным. Причина синдрома Рейе пока неизвестна.

Снижение активности карнитин-пальмитоилтрансферазы печени приводит к гипогликемии и понижению содержания кетоновых тел в плазме крови, а **снижение активности карнитин-пальмитоилтрансферазы мышц** — к нарушению процесса окисления жирных кислот, в результате чего периодически возникает мышечная слабость и развивается миоглобинурия.

Ямайская рвотная болезнь возникает у людей после употребления в пищу незрелых плодов аки (Blighia sapida), которые содержат токсин **гипоглицин**, инактивирующий ацил-СоА-дегидрогеназу, в результате чего ингибируется процесс β-окисления.

При **дикарбоновой ацидурии** происходит экскреция C_6—C_{10}—дикарбоновых кислот и развивается гипогликемия, не связанная с повышением содержания кетоновых тел. Причиной данного заболевания является отсутствие в митохондриях ацил-СоА-дегидрогеназы среднецепочечных жирных кислот. При этом нарушается β-окисление и усиливается ω-окисление длинноцепочечных жирных кислот, которые укорачиваются до среднецепочечных дикарбоновых кислот, выводимых из организма.

Болезнь Рефсума является редким неврологическим заболеванием, которое вызывается накоплением в тканях фитановой кислоты, образующейся из фитола; последний входит в состав хлорофилла, поступающего в организм с продуктами растительного происхождения. Фитановая кислота содержит метильную группу у третьего атома углерода, это блокирует ее β-окисление. В норме эта метильная группа

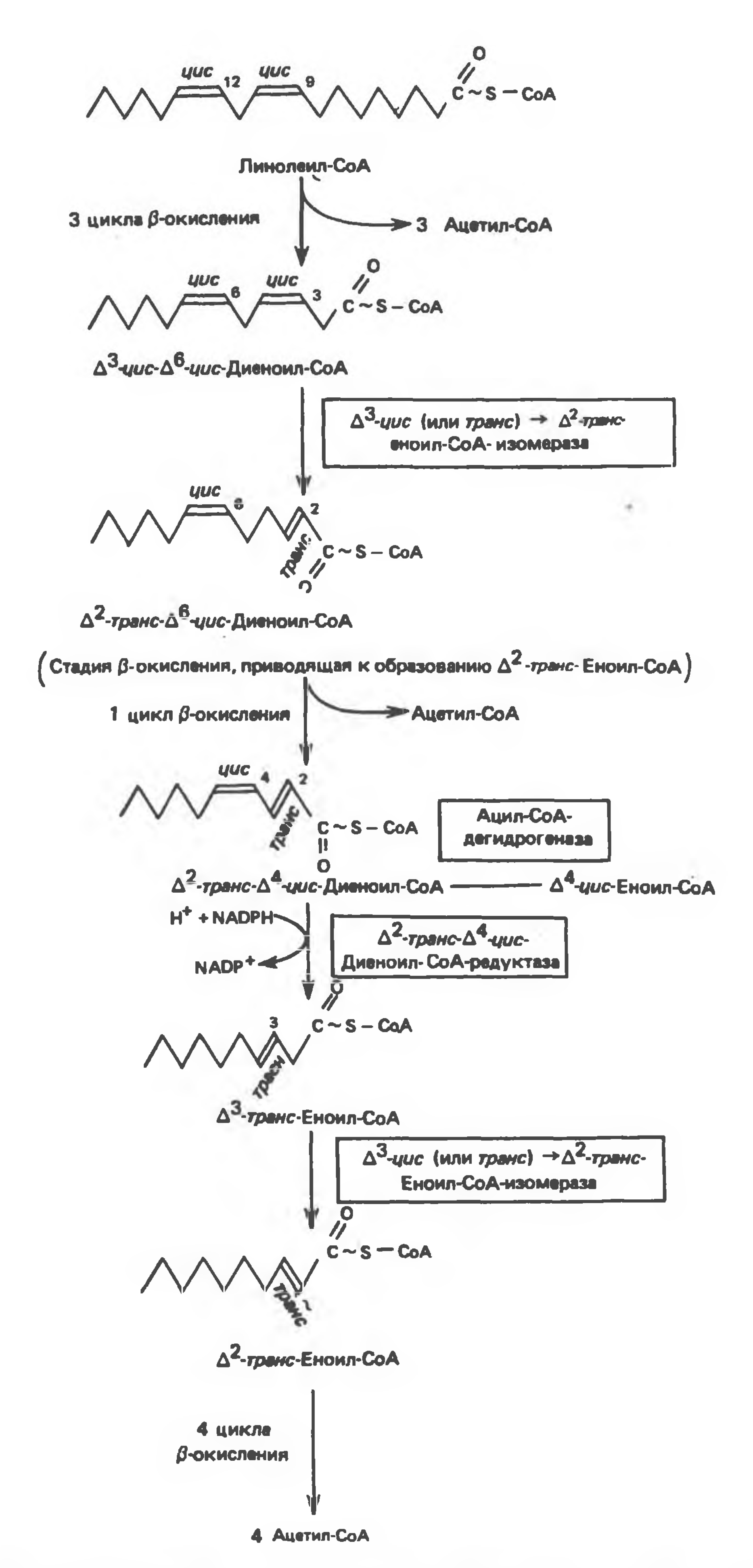


Рис. 23.4. Последовательность реакций окисления ненасыщенных жирных кислот на примере линолевой кислоты. Δ^4-*цис*-Жирные кислоты либо жирные кислоты, образующие Δ^4-*цис*-еноил-CoA, вступают на данный путь на стадии, указанной на схеме.

удаляется при α-окислении, но у людей, страдающих болезнью Рефсума, имеется врожденное нарушение системы α-окисления, что приводит к накоплению фитановой кислоты в тканях.

Синдром Цельвегера (Zellweger) или **цереброгепаторенальный синдром** является редким наследственным заболеванием, при котором во всех тканях отсутствуют пероксисомы. У больных, страдающих синдромом Цельвегера, в мозгу накапливаются C_{26}—C_{38}—полиеновые кислоты, поскольку из-за отсутствия пероксисом у них не происходит процесс окисления длинноцепочечных жирных кислот.

Окисление ненасыщенных жирных кислот

СоА-производные ненасыщенных жирных кислот атакуются ферментами, катализирующими β-окисление до стадии, на которой в зависимости от локализации двойных связей образуется либо Δ^3-*цис*-ацил-СоА-, либо Δ^4-*цис*-ацил-СоА-производное (рис. 23.4); затем Δ^3-*цис*-ацил-СоА изомеризуется под действием **Δ^3-*цис* → Δ^2-*транс*-еноил-СоА-изомеразы** с образованием Δ^2-*транс*-еноил-СоА. Последний вступает далее в обычную последовательность реакций β-окисления. Любое Δ^4-*цис*-ацил-СоА-производное, либо образовавшееся в ходе окисления из линолевой кислоты (рис. 23.4), либо вступившее в цикл на этой стадии, превращается под действием ацил-Соа-дегидрогеназы в Δ^2-*транс*-Δ^4-*цис*-диеноил-СоА; последний затем превращается в Δ^3-*транс*-еноил-СоА под действием NADP-зависимого фермента **Δ^2-*транс*-Δ^4-*цис*-диеноил-СоА-редуктазы**. Далее Δ^3-*цис* → Δ^2-*транс*-еноил-СоА-изомераза атакует Δ^3-*транс*-двойную связь; в результате образуется Δ^2-*транс*-еноил-СоА, являющийся промежуточным соединением при β-окислении.

Перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот в микросомах

NADPH-зависимое перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот катализируется ферментами, локализованными в микросомах (см. с. 124). Антиоксиданты, например БГТ (бутилированный гидрокситолуол) и α-токоферол (витамин Е), ингибируют перекисное окисление липидов в микросомах.

БИОСИНТЕЗ НАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Ранее предполагали, что процессы расщепления являются обращением процессов синтеза (например, гликогенолиз и гликогенез), а синтез жирных кислот рассматривали как процесс, обратный их окислению.

В настоящее время установлено, что митохондриальная система биосинтеза жирных кислот, включающая несколько модифицированную последовательность реакции β-окисления, осуществляет только удлинение уже существующих в организме среднецепочечных жирных кислот, в то время как полный биосинтез пальмитиновой кислоты из ацетил-СоА активно протекает **вне митохондрий** по совершенно другому пути. Активная система, обеспечивающая **удлинение цепей** жирных кислот, имеется в эндоплазматическом ретикулуме.

Внемитохондриальная система биосинтеза de novo жирных кислот (липогенез)

Эта система находится в растворимой (цитозольной) фракции клеток многих органов, в частности печени, почек, мозга, легких, молочной железы, а также в жировой ткани. Биосинтез жирных кислот протекает с участием NADPH, ATP, Mn^{2+} и HCO_3^- (в качестве источника CO_2); субстратом является ацетил-СоА, конечным продуктом — пальмитиновая кислота. Потребности в кофакторах процессов биосинтеза и β-окисления значительно различаются.

Образование малонил-СоА

Первой реакцией биосинтеза жирных кислот, катализируемой **ацетил-СоА-карбоксилазой** и осуществляемой за счет энергии ATP, является карбоксилирование ацетил-СоА; источником CO_2 является бикарбонат. Для функционирования фермента необходим витамин **биотин** (рис. 23.5). Этот фермент состоит из переменного числа одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит биотин, биотинкарбоксилазу, карбоксибиотин-переносящий белок, транскарбоксилазу, а также регуляторный аллостерический центр, т. е. представляет собой **полиферментный комплекс**. Реакция протекает в две стадии: (1) карбоксилирование биотина с участием ATP (рис. 20.4) и (2) перенос карбоксильной группы на ацетил-СоА, в результате чего образуется **малонил-СоА**. Ацетил-СоА-карбоксилаза активируется цитратом и ингибируется длинноцепочечными ацил-СоА-производными. Активированная форма фермента легко полимеризуется с образованием нитей, состоящих из 10—20 протомеров.

Синтазный комплекс, катализирующий образование жирных кислот

Имеются два типа **синтазных комплексов, катализирующих биосинтез жирных кислот**; оба находятся в растворимой части клетки. У бактерий, растений и низших форм животных, таких, как эвглена, все индивидуальные ферменты синтазной системы находятся в виде автономных полипептидов; ацильные радикалы связаны с одним из них, получившим назва-

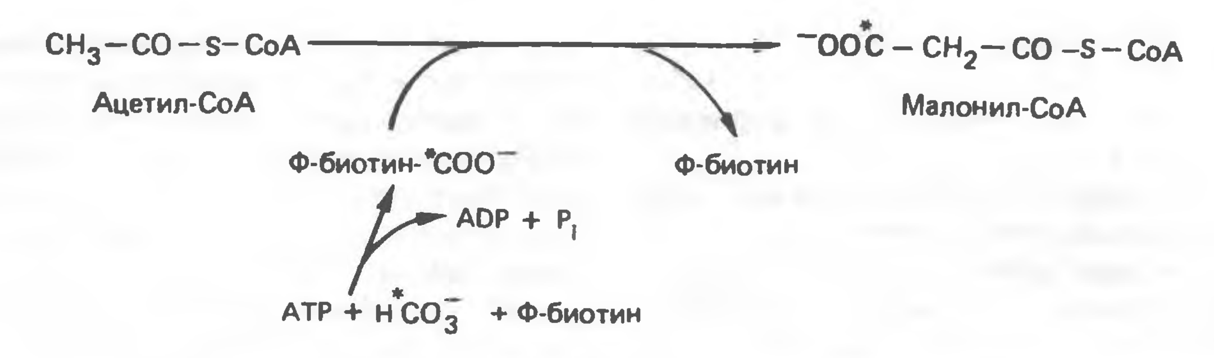


Рис. 23.5. Биосинтез малонил-СоА. Ф — ацетил-СоА-карбоксилаза.

ние **ацилпереносящий белок (АПБ)**. У дрожжей, млекопитающих и птиц синтазная система представляет собой полиферментный комплекс, который нельзя разделить на компоненты, не нарушив его активности, а АПБ является частью этого комплекса. Как АПБ бактерий, так и АПБ полиферментного комплекса содержат витамин пантотеновую кислоту в виде 4′-фосфопантетеина (см. рис. 17.6). В синтазной системе АПБ выполняет роль СоА. Синтазный комплекс, катализирующий образование жирных кислот, является димером (рис. 23.6). У животных мономеры идентичны и образованы одной полипептид-

Граница между функциональными адиницами

Еноил-редуктаза
Гидратаза
Кетоацил-редуктаза
АПБ
Тиоэстераза
1
4′-Фосфопантатеин
SH
Cys
SH
Граница между
мономерами
SH
4′-Фосфопантетеин
Тиоэстераза
АПБ
Кетоацил-редуктаза
Гидратаза
Еноил-редуктаза
2
SH
Cys

Рис. 23.6. Полиферментный комплекс, катализирующий синтез жирных кислот. Комплекс представляет собой димер, состоящий из двух идентичных полипептидных мономеров 1 и 2. Каждый мономер включает 6 индивидуальных ферментов и ацилпереносящий белок (АПБ). Cys—SH — тиоловая группа цистеина. Сульфгидрильная группа 4′-фосфопантетеина одного мономера расположена в непосредственной близости от такой же группы остатка цистеина кетоацилсинтетазы, входящей в состав другого мономера; это указывает на расположение мономеров по типу «голова к хвосту». Последовательность расположения ферментов в мономерах окончательно не уточнена и здесь приводится по данным Цукамото (Tsukamoto). Каждый из мономеров включает все ферменты, катализирующие биосинтез жирных кислот; он не является, однако, функциональной единицей (в состав последней входят фрагменты обоих мономеров, при этом половина одного мономера взаимодействует с «комплементарной» половиной другого). Синтазный комплекс одновременно синтезирует две молекулы жирных кислот.

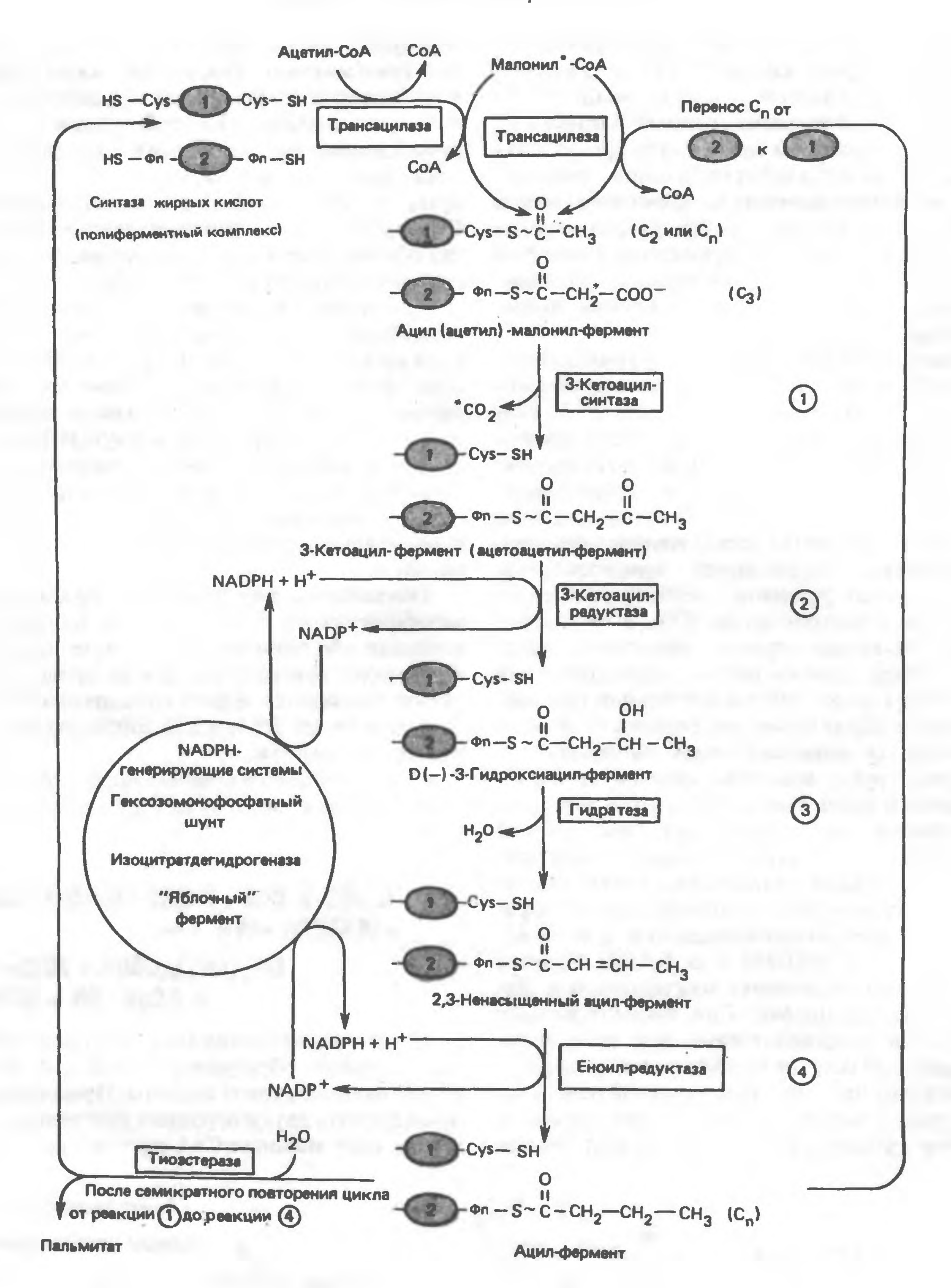


Рис. 23.7. Биосинтез длинноцепочечных жирных кислот. Показано, как присоединение одного малонильного остатка приводит к удлинению ацильной цепи на 2 углеродных атома. Cys — остаток цистеина; Фп — 4-фосфопантетеин. Строение синтазы жирных кислот показано на рис. 23.6. ① и ② — индивидуальные мономеры синтазы жирных кислот. На одном димере одновременно синтезируются 2 ацильные цепи, при этом используется 2 пары — SH-групп; в каждой паре одна из групп принадлежит Фп, а другая — Cys.

ной цепью, включающей 6 ферментов, катализирующих биосинтез жирных кислот, и АПБ с реакционноспособной SH-группой, принадлежащей 4'-фосфопантетеину. В непосредственной близости от этой группы расположена другая сульфгидрильная группа, принадлежащая остатку цистеина, входящего в состав **3-кетоацил-синтазы (конденсирующего фермента)**, которая входит в состав другого мономера (рис. 23.6). Поскольку для проявления синтазной активности необходимо участие обеих сульфгидрильных групп, синтазный комплекс **активен только в виде димера**.

На первом этапе процесса инициирующая молекула ацетил-CoA при участии **трансацилазы** взаимодействует с —SH-группой цистеина (рис. 23.7). Малонил-CoA под действием того же фермента (**трансацилазы**) взаимодействует с соседней —SH-группой, принадлежащей 4'-фосфопантетеину, локализованному в АПБ другого мономера. В результате этой реакции образуется **ацетил (ацил) малонил-фермент. 3-Кетоацилсинтаза** катализирует взаимодействие ацетильной группы фермента с метиленовой группой малонила и высвобождение CO_2, в результате образуется 3-кетоацил-фермент (ацетоацетил-фермент); при этом освобождается сульфгидрильная группа цистеина, ранее занятая ацетильной группой. Декарбоксилирование позволяет реакции пройти до конца и является движущей силой биосинтеза. 3-Кетоацильная группа восстанавливается, затем дегидратируется и вновь восстанавливается, в результате образуется соответствующий насыщенный ацил-S-фермент. Эти реакции сходны с соответствующими реакциями β-окисления; отличие заключается, в частности, в том, что при биосинтезе образуется D(−)-изомер 3-гидроксикислоты, а не L(+)-изомер, кроме того, NADPH, а не NADH является донором водорода в реакциях восстановления. Далее новая молекула малонил-CoA взаимодействует с —SH-группой фосфопантетеина, при этом насыщенный ацильный остаток перемещается на свободную —SH-группу цистеина. Цикл реакций повторяется еще 6 раз, и каждый новый остаток малоната встраивается в углеродную цепь, до тех пор пока не образуется насыщенный 16-углеродный ацилрадикал (пальмитоил). Последний высвобождается из полиферментного комплекса под действием шестого фермента, входящего в состав комплекса,— **тиоэстеразы** (деацилазы). Свободная пальмитиновая кислота, прежде чем вступить в другой метаболический путь, должна перейти в активную форму ацил-CoA-производного. Затем активированный пальмитат обычно подвергается эстерификации с образованием ацилглицеролов (рис. 23.8).

В молочной железе имеется особая тиоэстераза, специфичная к ацильным остаткам C_8-, C_{10}- или C_{12}-жирных кислот, входящих в состав липидов молока. В молочной железе жвачных животных этот фермент входит в состав синтазного комплекса, катализирующего образование жирных кислот.

По-видимому, в одном димерном синтазном комплексе имеются 2 активных центра, функционирующие независимо друг от друга, в результате одновременно образуются 2 молекулы пальмитиновой кислоты.

Объединение всех ферментов рассматриваемого метаболического пути в единый полиферментный комплекс обеспечивает его высокую эффективность и устраняет конкуренцию других процессов, в результате достигается эффект компартментации данного пути в клетке без участия дополнительных барьеров проницаемости.

Ниже приводится суммарная реакция биосинтеза пальмитиновой кислоты из ацетил-CoA и малонил-CoA:

$$CH_3CO\cdot S\cdot CoA + 7HOOC\cdot CH_2CO\cdot S\cdot CoA + 14NADPH + 14H^+ \longrightarrow CH_3(CH_2)_{14}COOH + 7CO_2 + 6H_2O + 8CoA\cdot SH + 14NADP^+$$

Из молекулы ацетил-CoA, выступающей в качестве затравки, образуются 15-й и 16-й углеродные атомы пальмитиновой кислоты. Присоединение всех последующих двухуглеродных фрагментов происходит за счет малонил-CoA-производного. В печени

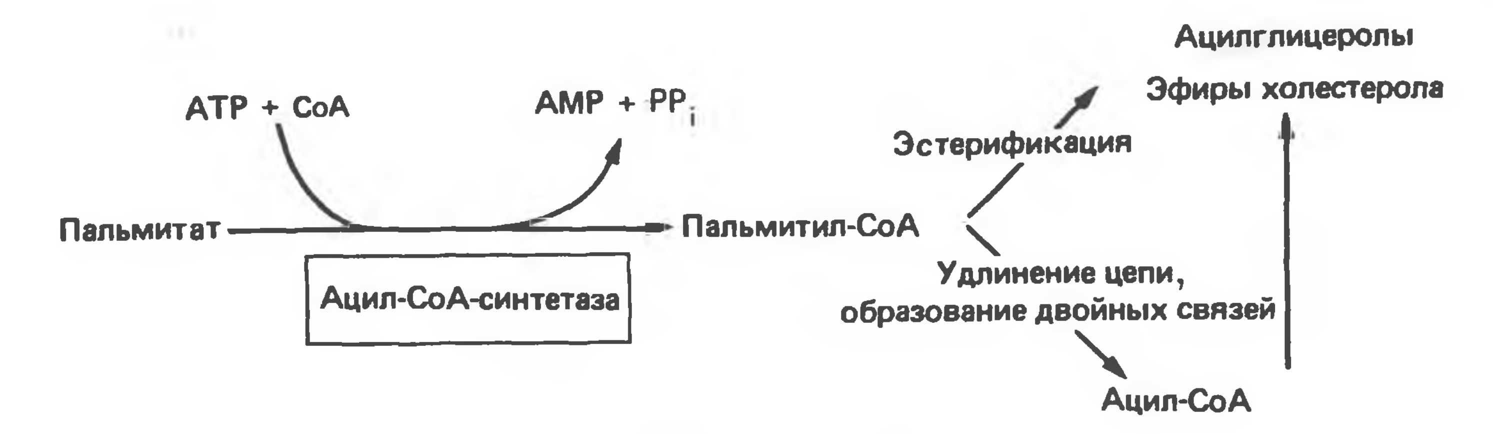


Рис. 23.8. Судьба пальмитата.

и молочной железе млекопитающих в качестве затравки может служить бутирил-СоА. Если в качестве затравки выступает пропионил-СоА, то синтезируются длинноцепочечные жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода. Такие жирные кислоты характерны в первую очередь для жвачных животных, у которых пропионовая кислота образуется в рубце под действием микроорганизмов.

Источники восстановительных эквивалентов и ацетил-СоА. В реакции восстановления как 3-кетоацил-, так и 2,3-ненасыщенных ацил-производных в качестве кофермента используется NADPH. Водород, необходимый для восстановительного биосинтеза жирных кислот, образуется в ходе окислительных реакций пентозофосфатного пути. Важно отметить, что ткани, в которых активно функционирует пентозо-

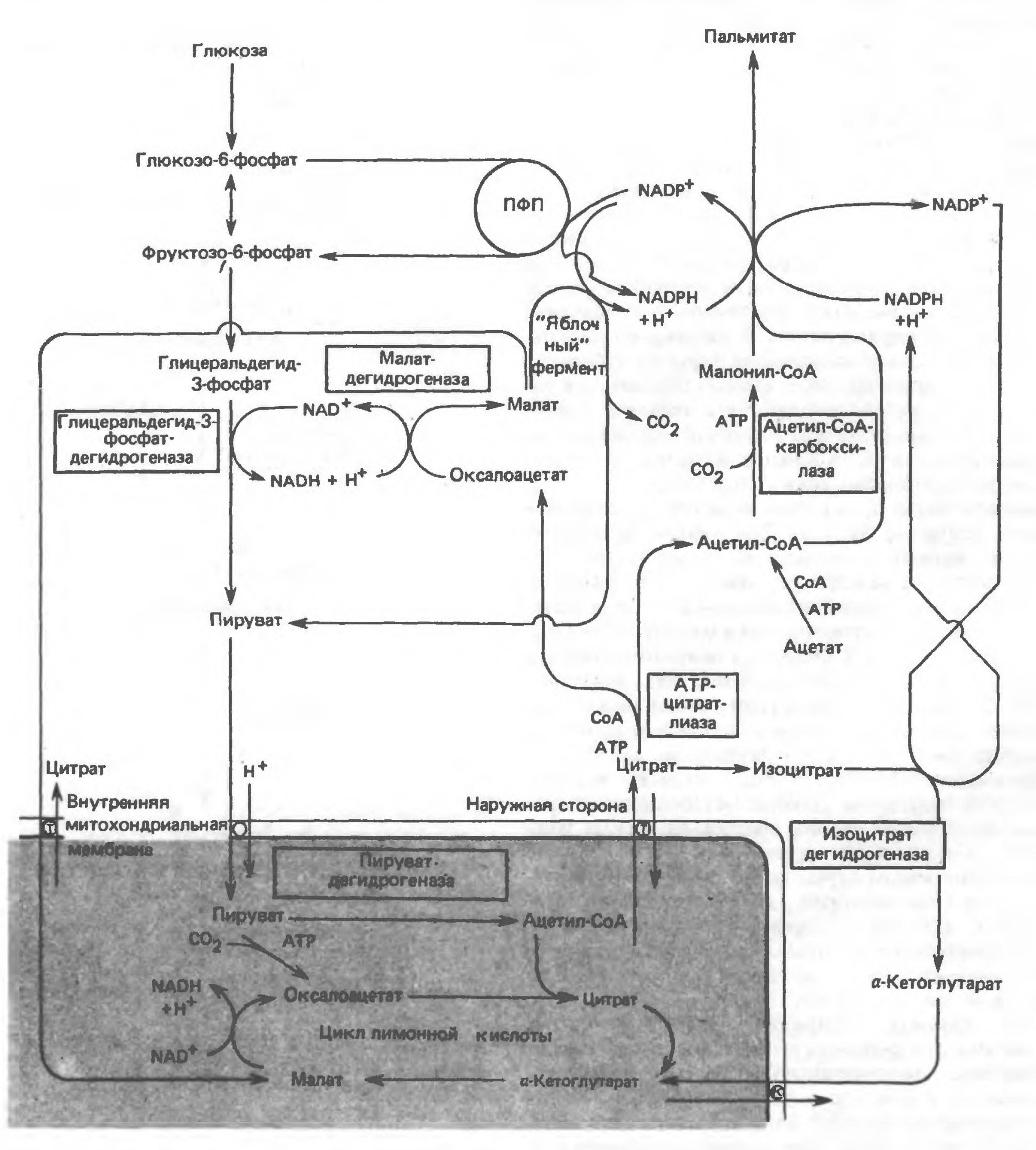


Рис. 23.9. Источники ацетил-СоА и NADPH для липогенеза. ПФП — пентозофосфатный путь; Т — трикарбоксилат-переносящая система; К — α-кетоглутарат-переносящая система

фосфатный путь, способны эффективно осуществлять липогенез (например, печень, жировая ткань и молочная железа в период лактации). Кроме того, оба метаболических пути протекают в клетке вне митохондрий, поэтому переходу NADPH/NADP от одного метаболического пути к другому не препятствуют мембраны или другие барьеры. Другими источниками NADPH являются реакция превращения малата в пируват, катализируемая **«яблочным» ферментом** (NADP-малатдегидрогеназой) (рис. 23.9), а также внемитохондриальная реакция, катализируемая **изоцитратдегидрогеназой** (вероятно, роль ее незначительна).

Ацетил-CoA, являющийся строительным блоком для синтеза жирных кислот, образуется в митохондриях из углеводов в результате окисления пирувата. Однако ацетил-CoA не может свободно проникать во внемитохондриальный компартмент — главное место биосинтеза жирных кислот. Активности внемитохондриальной **АТР-цитрат-лиазы** и «яблочного» фермента при хорошем питании увеличиваются параллельно активностям ферментов, участвующих в биосинтезе жирных кислот. В настоящее время полагают, что путь использования пирувата в процессе липогенеза проходит через стадию образования цитрата. Этот метаболический путь включает гликолиз, затем окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетил-CoA в митохондриях и последующую реакцию конденсации с оксалоацетатом с образованием цитрата, который является компонентом цикла лимонной кислоты. Далее **цитрат перемещается** во внемитохондриальный компартмент, где АТР-цитрат-лиаза в присутствии CoA и АТР катализирует его расщепление на ацетил-CoA и оксалоацетат. Ацетил-CoA превращается в малонил-CoA (рис. 23.5) и включается в биосинтез пальмитиновой кислоты (рис. 23.9). Оксалоацетат под действием NADH-зависимой малатдегидрогеназы может превращаться в малат, затем в результате реакции, катализируемой «яблочным» ферментом, происходит образование NADPH, который поставляет водород для пути липогенеза. Данный метаболический процесс обеспечивает перенос восстановительных эквивалентов от внемитохондриального NADH к NADP. В альтернативном случае малат может транспортироваться в митохондрии, где превращается в оксалоацетат. Следует подчеркнуть, что для работы цитрат(трикарбоксилат)-транспортирующей системы митохондрий необходим малат, который обменивается на цитрат (см. рис. 13.16).

У жвачных содержание АТР-цитрат-лиазы и «яблочного» фермента в тканях, осуществляющих липогенез, незначительно. Это связано, по-видимому, с тем, что у этих животных основным источником ацетил-CoA является ацетат, образующийся в рубце. Поскольку ацетат активируется до ацетил-CoA внемитохондриально, ему не нужно проникать в митохондрии и превращаться в цитрат, прежде чем включиться в путь биосинтеза длинноцепочечных жирных кислот. У жвачных животных из-за низкой активности «яблочного» фермента особое значение приобретает образование NADPH, катали-

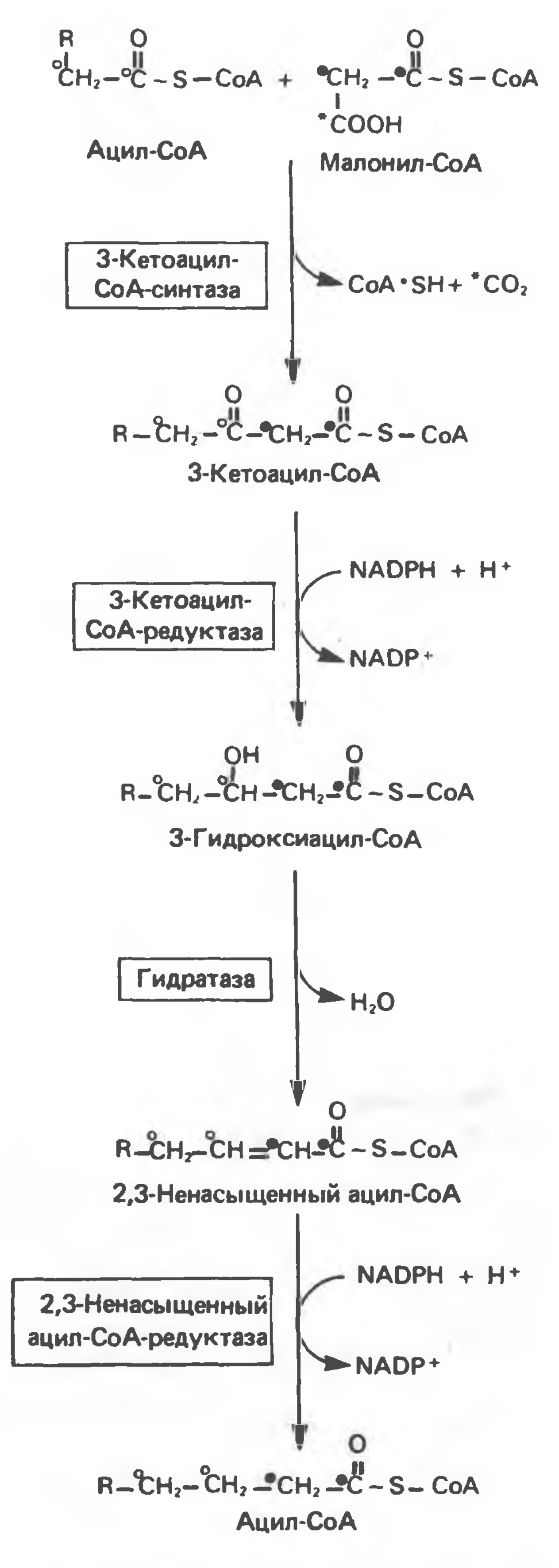


Рис. 23.10. Микросомальная система удлинения цепи жирной кислоты (элонгазная система).

зируемое внемитохондриальной изоцитратдегидрогеназой.

Микросомальная система удлинения цепей жирных кислот (элонгаза)

Микросомы, по-видимому, являются основным местом, где происходит удлинение длинноцепочечных жирных кислот. Ацил-СоА-производные жирных кислот превращаются в соединения, содержащие на 2 атома углерода больше; малонил-СоА является донором ацетильной группы, а NADPH — восстановителем. Промежуточными соединениями рассматриваемого пути являются тиоэфиры СоА. Затравочными молекулами могут служить насыщенные (C_{10} и выше) и ненасыщенные жирные кислоты. При голодании процесс удлинения цепей жирных кислот затормаживается. При образовании миелиновых оболочек нервных клеток в мозгу резко усиливается процесс удлинения стеарил-СоА, в результате образуются C_{22}- и C_{24}-жирные кислоты, входящие в состав сфинголипидов (рис. 23.10).

ЛИТЕРАТУРА

Boyer P. D. (ed.). The Enzymes, 3rd ed., Vol. 16 of Lipid Enzymology, Academic Press, 1983.

Debeer L. J., Mannaerts G. P. The mitochondrial and peroxisomal pathways of fatty acid oxidation in rat liver, Diabete Metab. (Paris), 1983, **9**, 134.

Goodridge A. G. Fatty acid synthesis in eukaryotes, Page 143. In: Biochemistry of Lipids and Membranes, Vance D. E., Vance J. E. (eds.), Benjamin/Cummings, 1985.

Gurr M. I., James A. I. Lipid Biochemistry: An Introduction, 3rd ed., Wiley, 1980.

Pande S. V., Parvin R. Page 143. In: Carnitine Biosynthesis, Metabolism, and Functions, Frenkel R. A., McGarry J. D. (eds.), Academic Press, 1980.

Schulz H. Oxidation of fatty acids, Page 116. In: Biochemistry of Lipids and Membranes, Vance D. E., Vance J. E. (eds.), Benjamin/Cummings, 1985.

Singh N., Wakil S. J., Stoops J. K. On the question of half- or fullsite reactivity of animal fatty acid synthetase, J. Biol. Chem., 1984, **259**, 3605.

Tsukamoto Y. et al. The architecture of the animal fatty acid synthetase complex, J. Biol. Chem., 1983, **258**, 15312.

Various authors. Disorders characterized by evidence of abnormal lipid metabolism. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., Stanbury J. B. et al. (eds.), McGraw-Hill, 1983.

Глава 24

Метаболизм ненасыщенных жирных кислот и эйкозаноидов

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

В отличие от растительных тканей ткани животных обладают весьма ограниченной способностью превращать насыщенные жирные кислоты в ненасыщенные. Поэтому в пище животных должны обязательно присутствовать некоторые полиненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в продуктах растительного происхождения. Эти незаменимые жирные кислоты являются предшественниками эйкозановых (C_{20}) жирных кислот, из которых затем образуются семейства соединений, известных под общим названием эйкозаноиды. К ним относятся простагландины, тромбоксаны и лейкотриены.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

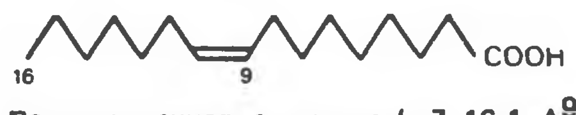
Точка плавления, а следовательно, и текучесть жиров зависят от содержания в них ненасыщенных жирных кислот. Фосфолипиды клеточных мембран содержат ненасыщенные кислоты, которые играют важную роль в обеспечении текучести мембран. Достаточно высокая величина отношения полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот в пищевом рационе является основным фактором, обеспечивающим снижение холестерола в плазме крови, и, как полагают, способствует предотвращению развития ишемической болезни сердца. Простагландины и тромбоксаны являются гормонами местного действия; при необходимости они быстро синтезируются и действуют в непосредственной близости от места их синтеза. Противовоспалительное действие лекарственных препаратов нестероидной природы, например аспирина, обусловлено ингибированием синтеза простагландинов. Основная физиологическая функция простагландинов состоит в модулировании активности аденилатциклазы и выражается, например, в регуляции агрегации тромбоцитов или ингибировании действия антидиуретического гормона в почках. Лейкотриены обладают свойством вызывать мышечное сокращение и хемотаксис, это позволяет предполагать, что они играют существенную роль в аллергических реакциях и при воспалении. Смесь лейкотриенов недавно была идентифицирована как «медленно реагирующая субстанция» при анафилаксии. Варьируя соотношение различных полиненасыщенных жирных кислот в пище, можно влиять на состав синтезируемых эйкозаноидов; поэтому представляется возможным воздействовать на протекание некоторых заболеваний с помощью специальной диеты.

МЕТАБОЛИЗМ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

На рис. 24.1 показаны некоторые длинноцепочечные ненасыщенные жирные кислоты, участвующие в метаболических процессах у млекопитающих (классификация жирных кислот приводится в гл. 15).

В тканях животных встречаются и другие C_{20}, C_{22} и C_{24} полиеновые жирные кислоты; они могут образовываться из линолевой и α-линоленовой кислот путем удлинения углеродной цепи. Следует подчеркнуть, что все двойные связи в ненасыщенных жирных кислотах, обычно встречающихся в тканях млекопитающих, имеют ***цис*-конформацию**.

Пальмитолеиновая и олеиновая кислоты не являются незаменимыми компонентами пищи, поскольку они могут образовываться в тканях из соответствующих насыщенных жирных кислот при введении одной двойной связи. Исследования, проведенные с меченым пальмитатом, показали, что метка быстро включается в пальмитолеиновую и олеиновую кислоты, а в линолевой, линоленовой и арахидоновой кислотах она отсутствует. Жирными кислотами, необходимыми для полноценного питания многих видов животных, в том числе и человека, являются **линолевая, α-линоленовая и арахидоновая кислоты**. Эти кислоты называются **незаменимыми жирными кислотами**, они должны входить в состав пищи. Следует, однако, уточнить, что, в то время как линолевая кислота не синтезируется в организме и должна обязательно поступать с пищей, арахидоновая кислота у большинства млекопитающих мо-



Пальмитолеиновая кислота (ω7, 16:1, Δ^9)

COOH
18 9

Олеиновая кислота (ω9, 18:1, Δ^9)

12 9 COOH
18

*Линолевая кислота (ω6, 18:2, $\Delta^{9,12}$)

18 15 12 9 COOH

*α-Линоленовая кислота (ω3, 18:3, $\Delta^{9,12,15}$)

14 11 8 5 COOH
20

*Арахидоновая кислота (ω6, 20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$)

20 17 14 11 8 5 COOH

Эйкозапентаеновая кислота (ω3, 20:5, $\Delta^{5,8,11,14,17}$)

Рис. 24.1. Структуры некоторых ненасыщенных жирных кислот. Атомы углерода в молекулах пронумерованы традиционно, т. е. начиная с карбоксильного конца; числа при знаке ω (например, ω7 в пальмитолеиновой кислоте) указывают положение двойной связи от противоположного конца (концевой метильной группы) молекулы жирной кислоты. Данные в скобках показывают, например, что в пальмитолеиновой кислоте двойная связь находится у седьмого атома углерода от концевой метильной группы (ω7), она содержит 16 атомов углерода и имеет одну двойную связь (16:1), а также то обстоятельство, что эта двойная связь расположена у девятого атома углерода от карбоксильного конца (Δ^9). Подобным образом α-линоленовая кислота содержит двойные связи, первая из которых находится у третьего от концевой метильной группы атома углерода, в ее состав входят 16 атомов углерода; всего она имеет 3 двойные связи, которые находятся у атомов углерода 9, 12 и 15, считая от карбоксильного конца. Вещества, отмеченные звездочкой, классифицируются как незаменимые жирные кислоты.

жет образовываться из линолевой (рис. 24.4). У животных двойные связи образуются в Δ^4-, Δ^5-, Δ^6- и Δ^9-положениях жирной кислоты, считая от карбоксильного конца (см. гл. 15 и 23), но не далее Δ^9-положения, в то время как у растений двойные связи могут образовываться в Δ^6-, Δ^9-, Δ^{12}- и Δ^{15}-положениях.

СИНТЕЗ МОНОНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ Δ^9-ДЕСАТУРАЗНОЙ СИСТЕМОЙ (РИС. 24.2)

Полагают, что мононенасыщенные жирные кислоты образуются из насыщенных жирных кислот в различных тканях, в том числе и в печени. Первая двойная связь появляется в насыщенной жирной кислоте почти всегда в Δ^9-положении. Превращение пальмитоил-СоА или олеил-СоА соответственно в стеароил-СоА или пальмитолеил-СоА катализирует Δ^9-десатуразная ферментная система, локализованная в эндоплазматическом ретикулуме; в реакции участвуют кислород и NADH или NADPH. Ферменты, входящие в эту систему, по-видимому, относятся

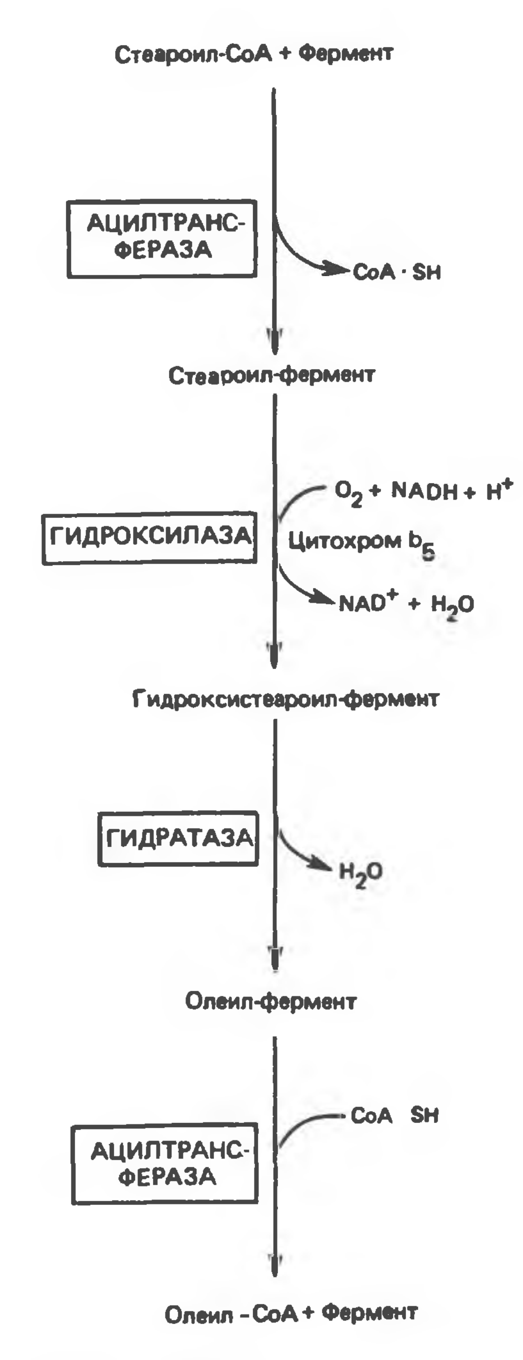


Рис. 24.2. Микросомальная Δ^9-десатуразная система.

к типичным монооксигеназам и функционируют при участии цитохрома b_5 (гидроксилазы).

СИНТЕЗ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (РИС. 24.3)

Дополнительные двойные связи, вводимые в мононенасыщенные жирные кислоты, всегда отделены друг от друга метиленовой группой. Это положение не соблюдается, однако, при метаболизме бактерий. У животных все дополнительные двойные связи **возникают между уже существующей двойной связью и карбоксильной группой**, однако у растений они могут также образовываться между уже существующей двойной связью и ω-углеродным (концевым метильным) атомом. Таким образом, поскольку у животных имеется Δ^9-десатуразная система, они могут синтезировать ненасыщенные жирные кислоты ряда олеиновой кислоты (ω9) путем комбинирования реакций элонгации и десатурации (рис. 24.3). Однако животные не способны синтезировать ни линолевую (ω6), ни α-линоленовую (ω3) кислоты из-за отсутствия соответствующих десатураз; поэтому **эти кислоты должны обязательно поступать с пищей, т. к. они необходимы для синтеза других полиненасыщенных жирных кислот рядов ω6 и ω3**. В организме линолевая кислота может превращаться в арахидоновую кислоту (рис. 24.4). На первом этапе превращения происходит дегидрирование линолеил-СоА с образованием **γ-линолената**, который затем при участии микросомальной системы удлинения цепи взаимодействует с малонил-СоА и удлиняется на 2 атома углерода; в результате образуется эйкозатриеноат (дигомо-γ-линоленат). Последний подвергается дегидрированию до арахидоновой кислоты. Дегидрирующая система подобна той, которая была описана выше для насыщенных жирных кислот. Таким образом, **если с пищей поступает достаточное количество линоленовой кислоты, потребности организма в арахидоновой кислоте могут быть полностью удовлетворены**.

При голодании и недостатке инсулина процессы десатурации и элонгации значительно ослабевают.

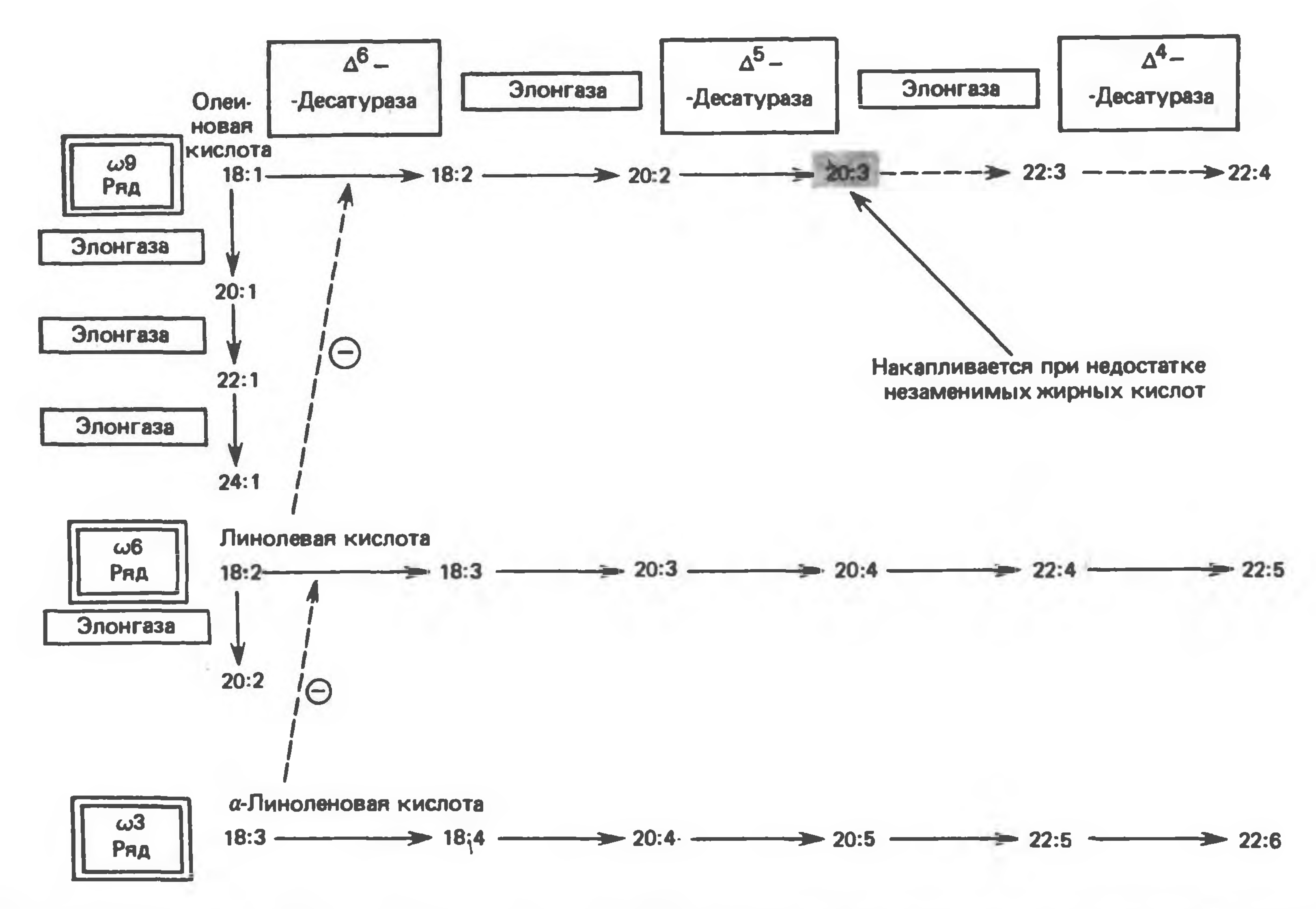


Рис. 24.3. Биосинтез полиненасыщенных кислот рядов ω9, ω6 и ω3. Соответствующие стадии катализируются либо микросомальной системой удлинения цепей, либо микросомальной десатуразной системой. Полиненасыщенные жирные кислоты ряда ω9 синтезируются в существенном количестве только в том случае, если с пищей не поступают линолевая и α-линоленовая кислоты. Это объясняется тем, что все ряды полиненасыщенных жирных кислот конкурируют за одну и ту же ферментную систему, а аффинность ее уменьшается от ряда ω3 к ряду ω9. ⊖ — ингибирование.

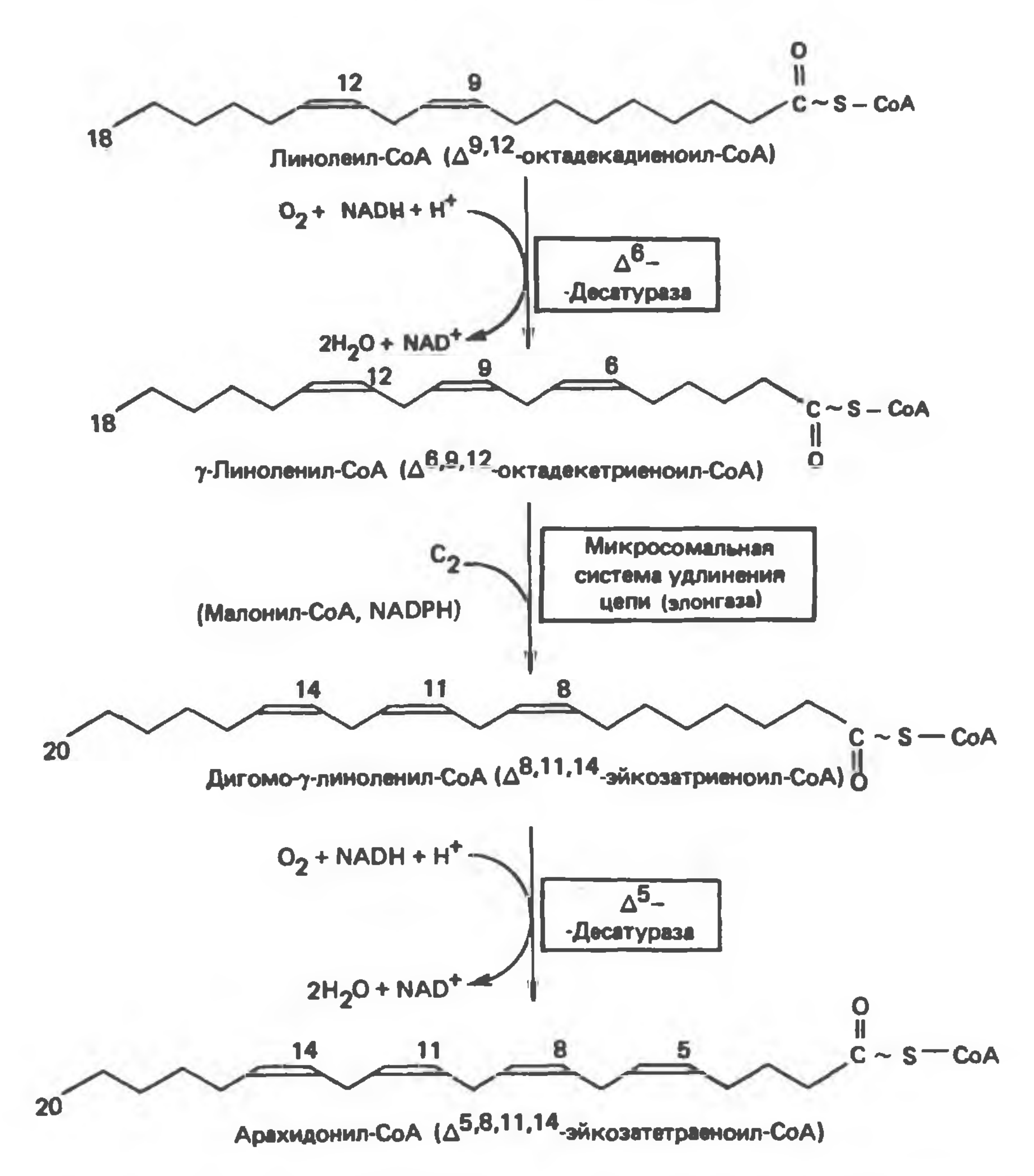


Рис. 24.4. Путь превращения линолеата в арахидонат; у представителей семейства кошачьих данное превращение не происходит из-за отсутствия Δ^6-десатуразы, поэтому они должны получать арахидонат с пищей.

НЕЗАМЕНИМЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ (НЖК)

В 1928 г. Эванс и Бэрр обнаружили, что у крыс, получающих рацион, полностью лишенный жиров, однако содержащий витамины А и D, наблюдается замедление роста и снижение плодовитости. В последующих работах было показано, что этот синдром недостаточности можно лечить, добавляя в пищу **линолевую, α-линоленовую и арахидоновую кислоты**. Другими симптомами данного синдрома являются чешуйчатый дерматит, некроз хвоста и поражение мочевой системы; к летальному исходу синдром обычно не приводит. Незаменимые жирные кислоты содержатся в достаточно больших количествах в растительных маслах (см. с. 153) и в небольших количествах — в тканях животных.

Помимо того что незаменимые жирные кислоты используются в качестве предшественников в биосинтезе простагландинов и лейкотриенов (см. ниже), они выполняют, по-видимому, еще ряд других функций, которые полностью пока не выяснены. Незаменимые жирные кислоты входят в состав структурных липидов клетки, они важны для формирования структуры митохондриальных мембран и в больших количествах обнаружены в органах размножения. Выполняя структурные функции, незаменимые жирные кислоты входят в состав фосфолипидов (преимущественно они находятся во 2-м положении). **При недостатке незаменимых жирных кислот** их место в фосфолипидах, других сложных липидах и мембранах занимают другие полиеновые кислоты ряда ω 9, обычно $\Delta^{5,8,11}$-эйкозатриеновая кислота. Соотношение триеновых и тетраеновых (арахидоновой) кислот в липидах плазмы крови может быть использовано для определения степени недостатка незаменимых жирных кислот.

У людей, в диете которых отсутствовали незаменимые жирные кислоты, развивался чешуйчатый дерматит и отмечались нарушения транспорта липидов. При обычном питании у взрослых людей симптомов недостатка незаменимых жирных кислот не наблюдалось. Однако у грудных детей, получающих искусственное питание с незначительным содержанием жиров, развивался чешуйчатый дерматит, ко-

торый легко поддавался лечению препаратом линолевой кислоты. Нарушения, связанные с недостатком незаменимых жирных кислот, в том числе α-линоленовой кислоты, наблюдаются также у больных, жизнедеятельность которых в течение длительного времени поддерживается только за счет внутривенного питания, почти лишенного жирных кислот. Для избежания этих нарушений необходимо, чтобы на долю незаменимых жирных кислот приходилось (по калорийности) не менее 1—2% от общей потребности в калориях.

Транс-ненасыщенные жирные кислоты

Транс-ненасыщенные жирные кислоты в следовых количествах присутствуют в жирах жвачных животных, у которых они образуются в рубце под действием микроорганизмов. Наличие больших количеств *транс*-ненасыщенных жирных кислот в частично гидрогенизированных растительных маслах (например, маргарине) ставит вопрос о безопасности их использования как компонента пищи. Какое действие оказывают эти кислоты при длительном употреблении на организм человека, пока не ясно, но по данным, полученным при аутопсии, до 15% жирных кислот находятся в *транс*-конфигурации. До настоящего времени серьезных доказательств отрицательного действия *транс*-ненасыщенных жирных кислот получено не было. Путь их метаболизма более похож на путь превращения насыщенных жирных кислот, чем на путь метаболизма *цис*-ненасыщенных жирных кислот; это, возможно, связано с тем, что насыщенные и *транс*-ненасыщенные жирные кислоты имеют сходную линейную конфигурацию углеродной цепи (см. гл. 15). *Транс*-полиненасыщенные жирные кислоты не обладают активностью незаменимых жирных кислот и могут выступать как антагонисты последних, усиливая тем самым проявления их недостатка в организме.

Клинические аспекты

Наряду с недостатком незаменимых жирных кислот и изменением соотношения индивидуальных ненасыщенных жирных кислот, которое может иметь место при хроническом голодании, нарушение метаболизма незаменимых жирных кислот наблюдается также при кистозном фиброзе, энтеропатическом акродерматите, гепаторенальном синдроме, синдроме Шегрена—Ларссона, полисистемной дегенерации нейронов, болезни Крона, циррозе печени, хроническом алкоголизме и синдроме Рейе. При приеме пищи с высоким соотношением полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот уровень холестерола в плазме крови, особенно в липопротеинах низкой плотности, уменьшается. Это обстоятельство рассматривается как благоприятное в свете взаимосвязи между содержанием холестерола в сыворотке и ишемической болезнью сердца.

ЭЙКОЗАНОИДЫ

Арахидонат и ряд других C_{20}-жирных кислот с двойными связями, чередующимися с метиленовыми группами, являются предшественниками эйкозаноидов. К этим физиологическим и фармакологически активным соединениям относятся **простагландины (ПГ), тромбоксаны (ТО)** и **лейкотриены (ЛТ)** (см. гл. 15). Арахидонат, обычно находящийся во 2-м положении фосфолипидов плазматической мембраны, высвобождается под действием фосфолипазы A_2 (рис. 25.5); он служит субстратом для биосинтеза $ПГ_2$, $ТО_2$ и $ЛТ_4$. Пути метаболизма арахидоната (субстрата) различны, причем синтез $ПГ_2$ и $ТО_2$ (**простаноидов**) конкурирует за субстрат с синтезом $ЛТ_4$. Эти два пути называют соответственно **циклооксигеназным** и **липоксигеназным** (рис. 24.5).

Эйкозаноиды можно разделить на три группы (в каждую входят ПГ, ТО и ЛТ) в зависимости от их предшественников — **линолеата, арахидоната** и **α-линолената** (рис. 24.6).

ПРОСТАНОИДЫ

Биосинтез

Синтез простаноидов (рис. 24.7) катализируется **простагландин-эндопероксид-синтазой,** обладающей двумя типами активности — **циклооксигеназной** и **пероксидазной**; в процессе участвуют две молекулы O_2. Продуктом циклооксигеназного пути является эндопероксидное производное, которое затем превращается в простагландины D, E и F, а также в тромбоксан ($ТОА_2$) и простациклин ($ПГI_2$). Клетки одного типа вырабатывают только один вид простаноидов. Аспирин и индометацин ингибируют действие циклооксигеназы.

Клинические аспекты

Тромбоксаны образуются в тромбоцитах и после выхода в кровяное русло вызывают сужение кровеносных сосудов и агрегацию тромбоцитов. **Простациклины** ($ПГI_2$) образуются в стенках кровеносных сосудов и являются сильными ингибиторами агрегации тромбоцитов. Таким образом, тромбоксаны и простациклины выступают как антагонисты. Эскимосы Гренландии весьма редко страдают сердечными заболеваниями, у них понижена агрегация тромбоцитов и замедлено свертывание крови; полагают, что это обусловлено потреблением большого количества рыбьего жира, содержащего 20:5 ω3 (эйкозапентаеновую кислоту, ЭПК), которая является предшественником простагландинов и тромбоксанов

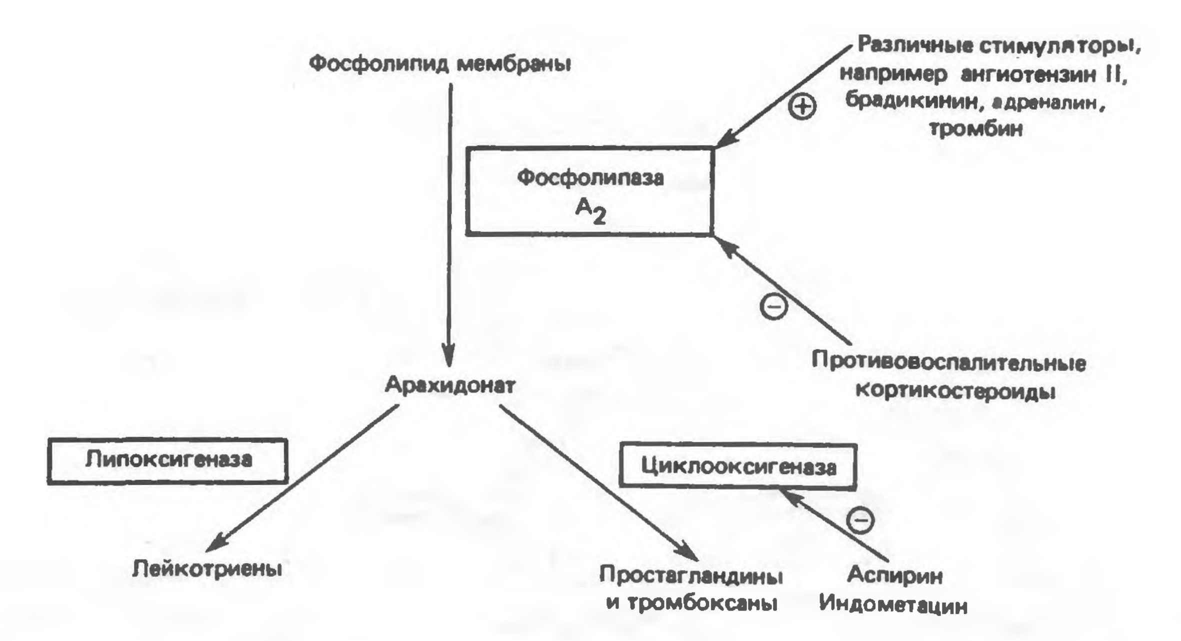


Рис. 24.5. Превращения арахидоновой кислоты в простагландины и тромбоксаны по циклооксигеназному пути и в лейкотриены по липоксигеназному пути. Из рисунка видно, почему стероиды, полностью ингибирующие процесс образования эйкозаноидов, являются более эффективными противовоспалительными средствами, чем аспирин и подобные ему лекарственные препараты, которые ингибируют только циклооксигеназный путь.

Пища
Линолеат
−2H
γ-Линоленат
+2C
COOH
8,11,14-Эйкозатриеноат (дигомо-γ-линоленат)
Группа 1
Простаноиды
① $ПГЕ_1$, $ПГF_1$, $ТОА_1$
−2H
Лейкотриены
② $ЛТА_3$, $ЛТС_3$, $ЛТD_3$
Пища
COOH
5,8,11,14-Эйкоза тетраеноат
Арахидонат
Группа 2
Простаноиды
① $ПГD_2$, $ПГЕ_2$, $ПГF_2$, $ПГI_2$, $ТОА_2$
Лейкотриены
② $ЛТА_4$, $ЛТВ_4$, $ЛТС_4$, $ЛТD_4$, $ЛТЕ_4$
Группа 3
Простаноиды
① $ПГD_3$, $ПГЕ_3$, $ПГF_3$, $ПГI_3$, $ТОА_3$
Лейкотриены
② $ЛТА_5$, $ЛТВ_5$, $ЛТС_5$
Эйкозатетраеноат
−2H
COOH
5,8,11,14,17-Эйкоза пентаеноат (тимнодонат)
+2C
Октадекатетраеноат
−2H
α-Линоленат
Пища

Рис. 24.6. 3 группы эйкозаноидов и пути их биосинтеза. ПГ — простагландин; ПГI — простациклин; ТО — тромбоксан, ЛТ — лейкотриен; 1 — циклооксигеназный путь; 2 — липоксигеназный путь. Цифры около сокращенного названия эйкозаноида показывают число двойных связей в молекуле, а последняя буква — к какой группе принадлежит данное соединение.

Рис. 24.7. Превращения арахидоновой кислоты в простагландины и тромбоксаны 2-й группы. ПГ — простагландин; ТО — тромбоксан; ПГI — простациклин; ГГТ — гидроксигептадекатриеновая кислота. Отмеченные звездочкой активности принадлежат одному ферменту — простагландин-эндопероксид-синтазе. Аналогично образуются простагландины и тромбоксаны групп 1 и 3.

третьей группы ($ПГ_3$ и $ТО_3$) (рис. 24.6). $ПГ_3$ и $ТО_3$ ингибируют высвобождение арахидоната из фосфолипидов и образование $ПГ_2$ и $ТО_2$. $ПГI_3$ обладает такими же сильными антиагрегационными свойствами в отношении тромбоцитов, как и $ПГI_2$, однако $ТОА_3$ является более слабым стимулятором агрегации тромоцитов, чем $ТОА_2$. Таким образом, суммарный баланс активности снижает вероятность агрегации. Кроме того, содержание холестерола, триацилглицеролов и липопротеинов низкой и очень низкой плотности в плазме крови эскимосов понижено, в то время как концентрация липопротеинов высокой плотности повышена. Все эти факторы, как полагают, препятствуют возникновению атеросклероза и инфаркта миокарда.

Простагландины являются мощными биологически активными соединениями. При низких концентрациях (1 $нг \cdot мл^{-1}$) они вызывают сокращение гладкой мускулатуры у животных. Простагландины могут использоваться как терапевтические средства для предотвращения оплодотворения, для стимулирования нормальных родов, прерывания беременности, предупреждения развития или обезболивания язвы желудка, лечения воспалительных процессов и регуляции кровяного давления, а также для снятия приступов астмы и лечения насморка. Простагландины повышают уровень сАМР в тромбоцитах, щитовидной железе, желтом теле яичника, костной ткани плода, передней доле гипофиза и легких и снижают активность сАМР в клетках почечных канальцев и жировой ткани.

Незаменимые жирные кислоты и простагландины

Хотя существует четко выраженная корреляция между эффективностью различных жирных кислот в качестве незаменимых и их способностью превращаться в простагландины, физиологическое действие незаменимых жирных кислот не ограничивается участием в синтезе простагландинов. Например, участие в образовании мембран не связано с синтезом простагландинов. Недостаток незаменимых жирных кислот нельзя устранить введением проста-

гландинов, а длительное ингибирование процесса образования простагландинов не приводит к появлению симптомов недостатка незаменимых жирных кислот.

Удаление и инактивация простагландинов

«Выключение» образования простагландинов частично обеспечивается за счет удивительного свойства циклооксигеназы, которая способна катализировать собственную деструкцию, т. е. является своего рода ферментом-«самоубийцей». Инактивация образовавшихся простагландинов происходит очень быстро, по-видимому, главным образом под действием фермента **15-гидроксипростагландин-дегидрогеназы**, который присутствует почти во всех тканях млекопитающих. Недавно было показано, что при ингибировании этого фермента с помощью сульфасалазина или индометацина период полураспада простагландинов в организме удлиняется.

ЛЕЙКОТРИЕНЫ

Лейкотриены представляют собой группу сопряженных триенов, образующихся из эйкозановых кислот в лейкоцитах, клетках мастоцитомы, тромбоцитах и макрофагах по **липоксигеназному пути** в ответ на иммунологические и неиммунологические стимулы. Три различные липоксигеназы (диоксигеназы) катализируют введение кислорода в арахидоновую кислоту в положениях 5, 12 и 15, в результате чего образуется гидроксипероксид (гидропероксидэйкозатетраеноат, ГПЭТЕ). Лейкотриены образуются только под действием **5-липоксигеназы**. Первым синтезируется лейкотриен A_4, который в свою очередь превращается либо в лейкотриен B_4, либо в лейкотриен C_4 (рис. 24.8). Лейкотриен C_4 образуется путем присоединения трипептида глутатиона с образованием тиоэфирной связи. Последующее удаление глутамата и глицина приводит к образованию сначала лейкотриена D_4, а затем лейкотриена E_4.

Клинические аспекты

Медленно реагирующая субстанция при анафилаксии (МРВ-А) представляет собой смесь лейкотриенов C_4, D_4 и E_4. Эта смесь в 100—1000 раз более эффективна, чем гистамин или простагландины как

Рис. 24.8. Превращение арахидоновой кислоты в лейкотриены группы 4 по липоксигеназному пути. ГПЭТЕ — гидропероксиэйкозатетраеноат; ГЭТЕ — гидроксиэйкозатетраеноат. Сходные превращения происходят также при образовании лейкотриенов групп 3 и 5. 1 — пероксидаза; 2 — лейкотриен-A_4-эпоксидгидролаза; 3 — глутатион-S-трансфераза; 4 — γ-глутамилтрансфераза; 5 — цистеинил-глицин-дипептидаза.

фактор, вызывающий сокращение гладкой мускулатуры бронхов. Эти лейкотриены вместе с лейкотриеном B_4 повышают проницаемость кровеносных сосудов и вызывают приток и активацию лейкоцитов, а также, по-видимому, являются важными регуляторами при многих заболеваниях, в развитии которых участвуют воспалительные процессы или быстрые аллергические реакции (например, при астме).

ЛИТЕРАТУРА

Hammarström S. Leukotrienes. Annu. Rev. Biochem. 1983, **52**, 355.

Holman R. T. Control of polyunsaturated acids in tissue lipids, J. Am. Coll. Nutr., 1986, **5**, 183.

Kinsella J. E. Food components with potential therapeutic benefits: The n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils, Food Technology, 1986, **40**, 89.

Lewis R. A., Austen K. F. The biologically active leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology, J. Clin. Invest., 1984, **73**, 889.

Moncada S. (ed.). Prostacyclin, thromboxane and leukotrienes. Br. Med. Bull., 1983, **39**, 209.

Piper P. Formation and actions of leukotrienes, Physiol. Rev., 1984, **64**, 744.

Rivers J. P. W., Frankel T. L. Essential fatty acid deficiency. Br. Med. Bull., 1981, 37. 59.

Smith W. L., Borgeat P. The eicosanoids. In: Biochemistry of Lipids and Membranes. Vance D. E., Vance J. E. (eds). Benjamin/Cummings, 1985.

Глава 25

Метаболизм ацилглицеролов и сфинголипидов

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

В организме большая часть липидов представлена ацилглицеролами в виде триацилглицеролов; они являются главными липидами жировых отложений и пищи. Кроме того, ацилглицеролы, в первую очередь фосфолипиды, являются основными компонентами плазматических и других мембран. Фосфолипиды участвуют в метаболизме многих липидов. Гликофосфолипиды, построенные из сфингозина, остатков сахаров и жирных кислот, составляют 5—10% всех липидов плазматической мембраны.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Роль триацилглицеролов в транспорте и запасании липидов, а также в развитии таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет и гиперлипопротеинемия, будет детально рассмотрена в последующих главах. Фосфоглицеролы, фосфосфинголипиды и гликосфинголипиды представляют собой амфипатические липиды, поэтому они идеально выполняют функции основных компонентов плазматической мембраны. Некоторые фосфолипиды выполняют особые функции. Например, дипальмитоиллецитин является основным элементом сурфактанта (поверхностно-активного вещества) легких, который иногда отсутствует у недоношенных детей, в результате чего у них наблюдается расстройство дыхания. Фосфолипиды, содержащие инозитол, являются предшественниками вторых посредников при действии гормонов, а алкилфосфолипид—тромбоцит-активирующим фактором. Локализованные на внешней поверхности плазматической мембраны гликосфинголипиды, олигосахаридные цепи которых смотрят наружу, входят в состав гликокаликса клеточной поверхности и, по-видимому, выполняют важные функции, а именно: 1) участвуют в межклеточных взаимодействиях, 2) являются рецепторами бактериальных токсинов, например холерного токсина, и 3) являются соединениями, определяющими группы крови (система АВО). В настоящее время описано около дюжины болезней, связанных с накоплением гликолипидов (например, болезнь Гоше, болезнь Тея—Сакса), причиной которых является снижение активности локализованных в лизосомах гидролаз, катализирующих расщепление гликолипидов.

МЕТАБОЛИЗМ АЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ

Катаболизм триацилглицеролов

Путь катаболизма триацилглицеролов начинается с их гидролиза до жирных кислот и глицерола под действием липазы; в основном этот процесс происходит в жировой ткани. Высвободившиеся жирные кислоты поступают в плазму крови, где связываются сывороточным альбумином. Затем свободные жирные кислоты переходят в ткани, где они либо окисляются, либо вновь подвергаются эстерификации. Ткани многих органов (печени, сердца, почек, мышц, легких, семенников, мозга), а также жировая ткань способны окислять длинноцепочечные жирные кислоты. Однако поступление этих кислот в клетки мозга затруднено. Что касается судьбы глицерола, то она зависит от того, присутствует ли в данной ткани необходимый активирующий фермент—**глицеролкиназа** (рис. 25.1). Значительное количество этого фермента обнаружено в печени, почках, кишечнике, бурой жировой ткани и в молочных железах в период лактации.

Биосинтез ацилглицеролов

Хотя в лабораторных условиях можно осуществить реакции, обратные реакциям расщепления триацилглицеролов, в организме биосинтез ацилглицеролов протекает иным путем. Перед образованием ацилглицеролов глицерол и жирные кислоты должны быть активированы при участии АТР. Глицеролкиназа катализирует фосфорилирование глицерола, в результате образуется *sn*-глицерол-3-фосфат. При отсутствии данного фермен-

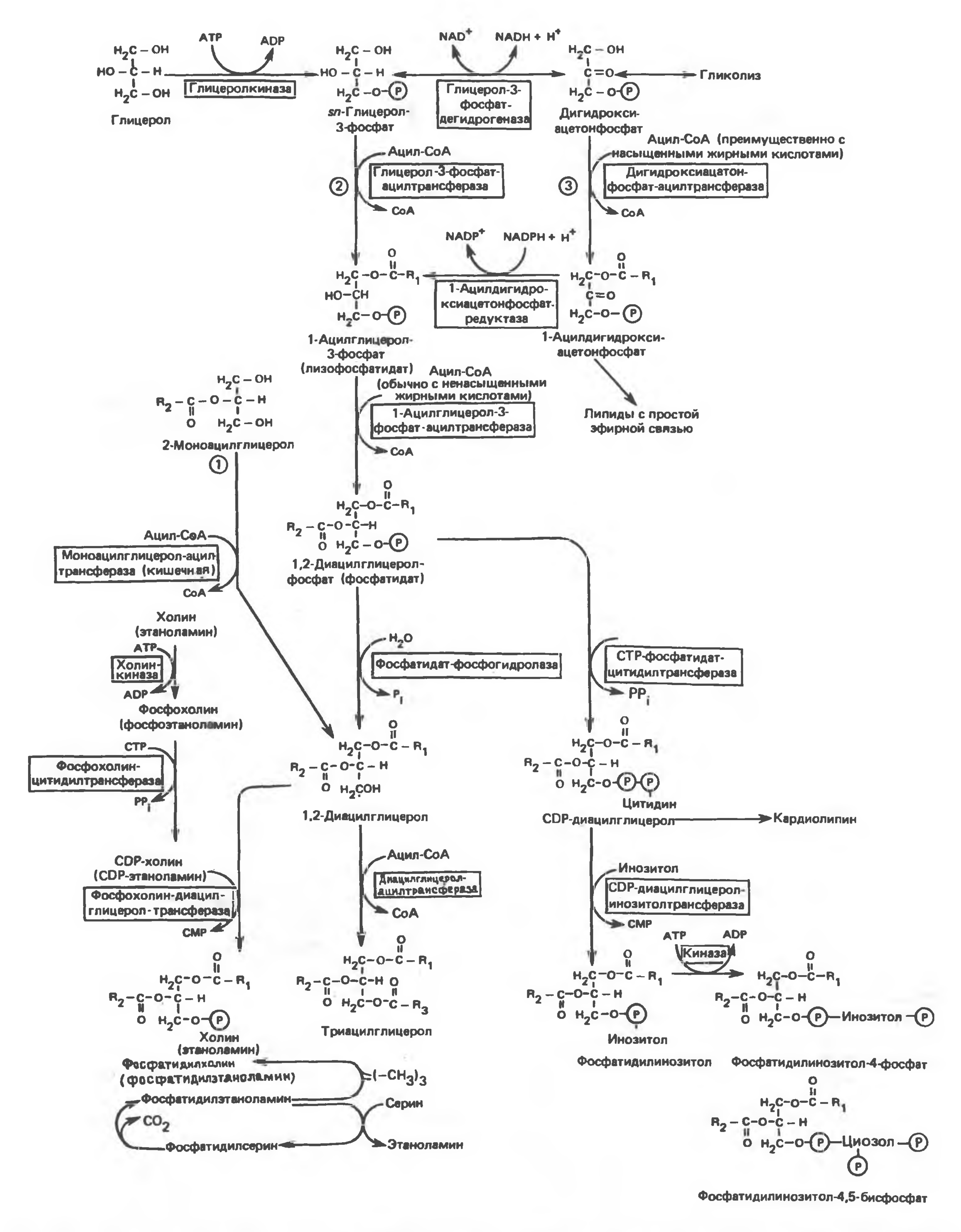


Рис. 25.1. Биосинтез триацилглицеролов и фосфолипидов. 1 — моноацилглицероловый путь; 2 — глицеролфосфатный путь; 3 — диоксиацетонфосфатный путь. Фосфоэтаноламин-диацилглицерол-трансфераза отсутствует в печени.

та или при его низкой активности, как это имеет место в мышцах и жировой ткани, бо́льшая часть глицерол-3-фосфата **должна образовываться из промежуточного соединения гликолитического пути — дигидроксиацетонфосфата**, восстановление которого за счет NADH до глицерол-3-фосфата катализируется **глицерол-3-фосфатдегидрогеназой** (рис. 25.1).

А. Триацилглицерол. Жирные кислоты активируются в результате взаимодействия с CoA с образованием ацил-CoA; реакция катализируется **ацил-CoA-синтетазой** и протекает с участием ATP. Две молекулы ацил-CoA взаимодействуют с глицерол-3-фосфатом, в результате образуется 1,2-диацилглицеролфосфат (фосфатидат). Этот процесс протекает в две стадии. Сначала **глицерол-3-фосфат — ацилтрансфераза** катализирует образование лизофосфатидата, а затем **1-ацилглицерол-3-фосфат — ацилтрансфераза** (лизофосфатидат — ацилтрансфераза) катализирует образование фосфатидата. Далее фосфатидат гидролизуется **фосфатидат — фосфогидролазой** до 1,2-диацилглицерола. В слизистой оболочке кишечника функционирует путь образования 1,2-диацилглицерола из моноацилглицерола, реакция катализируется **моноацилглицерол-ацилтрансферазой**. Далее 1,2-диацилглицерол ацилируется третьей молекулой ацил-CoA и превращается в триацилглицерол (эта реакция катализируется **диацилглицерол-ацилтрансферазой**). Большинство ферментов данного пути находятся в эндоплазматическом ретикулуме, и только некоторые, например глицерол-3-фосфат — ацилтрансфераза, в митохондриях. Фосфатидатфосфогидролазная активность обнаруживается главным образом в супернатантной фракции, часть ее связана с мембранами.

Дигидроксиацетонфосфат может ацилироваться и превращаться в лизофосфатидат путем востановления с участием NADPH. Относительно значения этого пути еще нет единого мнения. По-видимому, он играет важную роль в пероксисомах, где участвует **в биосинтезе липидов с простой эфирной связью**.

Б. Фосфоглицеролы. Эти фосфолипиды образуются либо из фосфатидата (например, фосфатидилинозитол), либо из 1,2-диацилглицерола (например, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин). При синтезе фосфатидилинозитола цитидинтрифосфат (CTP) взаимодействует с фосфатидатом с образованием цитидиндифосфатдиацилглицерола (CDP-диацилглицерол), который при участии фермента **CDP-диацилглицерол — инозитолтрансферазы** реагирует с инозитолом, в результате чего образуется фосфатидилинозитол (рис. 25.1). Последовательное фосфорилирование фосфатидилинозитола приводит к образованию сначала фосфатидилинозитол-4-фосфата, а затем фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. Последний гидролизуется с образованием диацилглицерола и инозитолтрифосфата (процесс запускается гормонами, в частности вазопрессином, которые повышают концентрацию Ca^{2+}). Эти два продукта действуют как вторые посредники при действии гормонов (рис. 44.5).

В процессе биосинтеза фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (лецитина и кефалина) холин и этаноламин должны сначала перейти в активную форму. На первой стадии процесса в результате реакции с ATP образуется соответствующий монофосфат, который затем реагирует с CTP, в результате чего образуется либо цитидиндифосфохолин (CDP-холин), либо цитидиндифосфоэтаноламин (CDP-этаноламин). В такой активной форме холин (или этаноламин) вступает в реакцию с 1,2-диацилглицеролом; происходит перенос фосфорилированного основания (фосфохолина или фосфоэтаноламина) на диацилглицерол и образуется либо фосфатидилхолин, либо фосфатидилэтаноламин. Регуляторным ферментом на пути образования фосфатидилхолина является, по-видимому, цитидилтрансфераза.

Фосфатидилсерин синтезируется путем прямого взаимодействия фосфатидилэтаноламина и серина. Фосфатидилсерин может декарбоксилироваться, в результате образуется фосфатидилэтаноламин. В печени существует альтернативный путь, по которому фосфатидилхолин синтезируется из фосфатидилэтаноламина путем последовательного метилирования остатка этаноламина с участием S-аденозилметионина в качестве донора метильных групп.

В митохондриях присутствует фосфолипид **кардиолипин** (дифосфатидилглицерол). Он образуется из фосфатидилглицерола, который в свою очередь синтезируется из CDP-диацилглицерола (рис. 25.1) и глицерол-3-фосфата, как показано на схеме, приведенной на рис. 25.2.

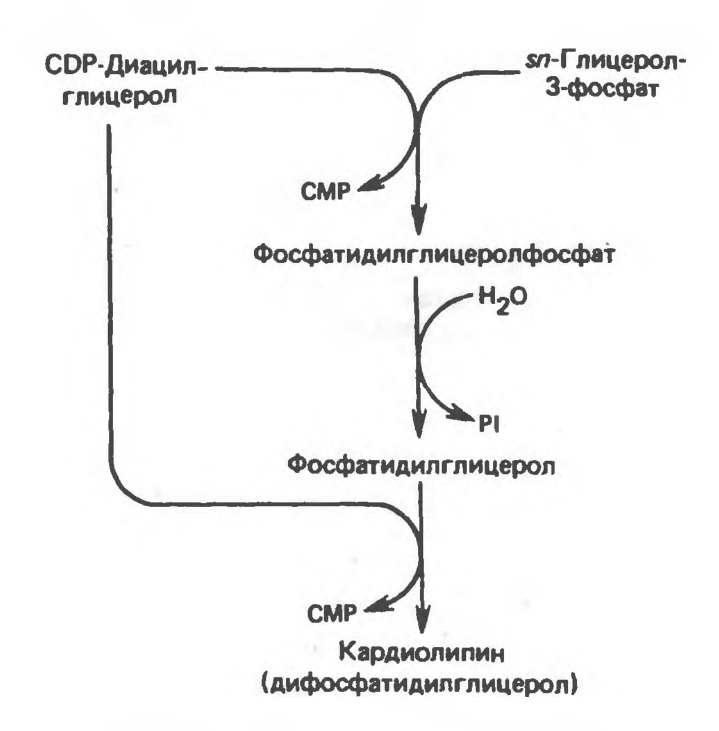


Рис. 25.2. Биосинтез кардиолипина.

Сурфактант (поверхностно-активное вещество) легких представляет собой секрет, обладающий высокими поверхностно-активными свойствами, который препятствует спадению легочных альвеол. Эти свойства сурфактанта объясняются главным образом присутствием в нем фосфолипида **дипальмитоилфосфатидилхолина**, который образуется в легких доношенного плода непосредственно перед родами. Недостаток этого соединения в легких недоношенных детей является причиной расстройства у них дыхания.

В. Глицерофосфолипиды с простой эфирной связью и плазмалогены. Предшественниками плазмалогенов являются диацилглицеролы, содержащие в положении 1 (или 2) алкенильный остаток, образующий альдегидогенную эфирную связь. Предшественником глицеролового фрагмента является дигидроксиацетонфосфат (рис. 25.3); взаимодействуя с ацил-CoA, он превращается в 1-ацилдигидроксиацетонфосфат. Затем происходит замещение ацильной группы на алкоксигруппу длинноцепочечного спирта с образованием 1-алкилдигидроксиацетонфосфата, содержащего простую эфирную связь; последний в присутствии NADPH превращается в 1-алкилглицерол-3-фосфат. Последующее ацилирование в положении 2 приводит к образованию 1-алкил, 2-ацилглицерол-3-фосфата (аналог фосфатидата, рис. 25.1), который гидролизуется до 1-алкил, 2-ацилглицерола (рис. 25.3). Плазмалогены образуются путем дегидрирования соответствующего производного 3-фосфоэтаноламина (рис. 25.3). В митохондриях большинство фосфолипидов представлено плазмалогенами. **Тромбоцит-активирующий фактор (ТАФ)** синтезируется из соответствующего производного 3-фосфохолина и идентифицирован как 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицерол-3-фосфохолин. Он образуется в большинстве клеток крови, а также ряда тканей и при концентрации порядка 10^{-11} моль·л$^{-1}$

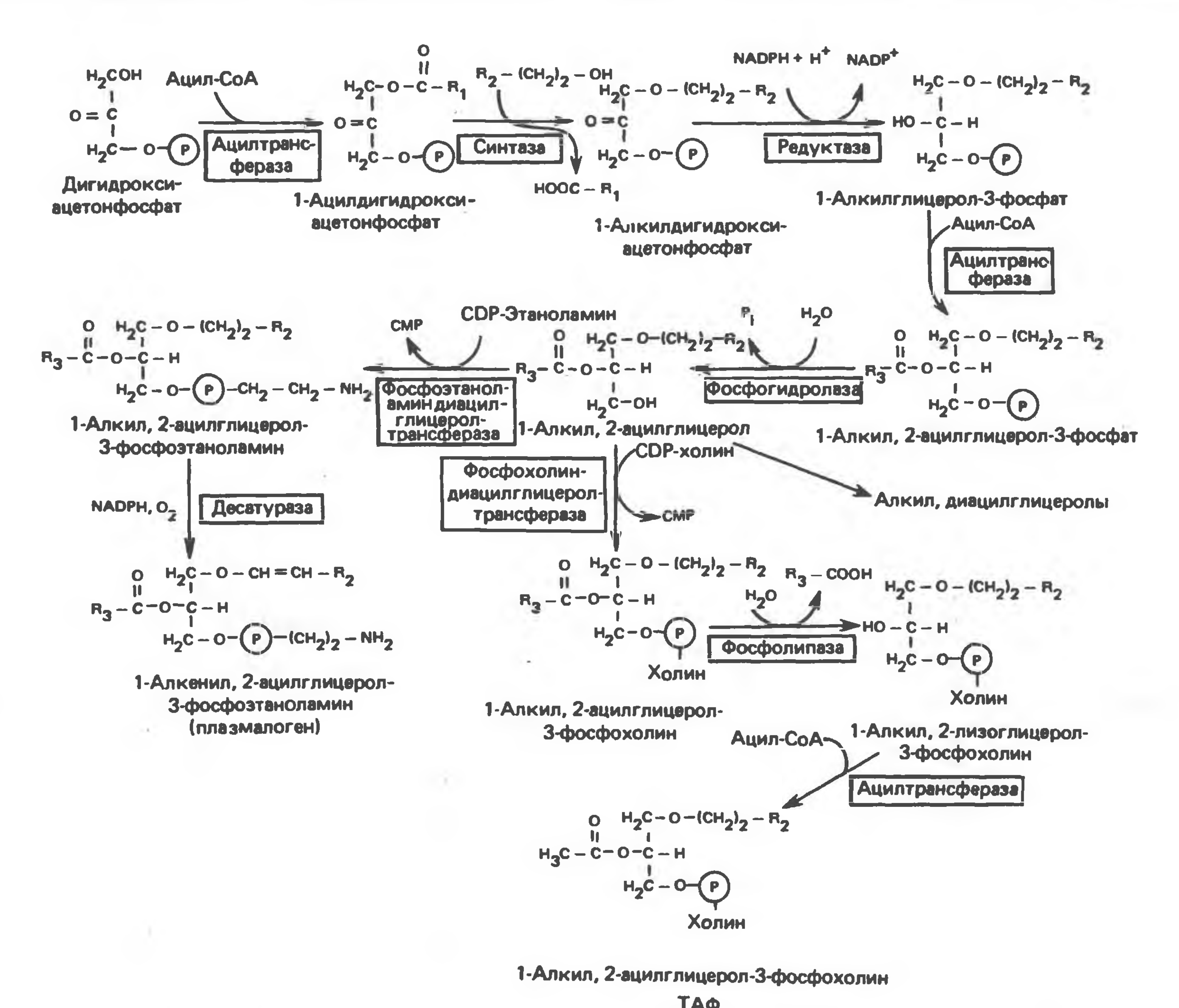


Рис. 25.3. Биосинтез липидов с простой эфирной связью, плазмалогенов и тромбоцит-активирующего фактора (ТАФ).

вызывает агрегацию тромбоцитов. ТАФ вызывает также снижение кровяного давления.

Распад и обновление глицерофосфолипидов

Многие сложные молекулы, например молекулы белков, расщепляются в тканях полностью. Поэтому для них можно определить время обновления. Фосфолипиды также активно распадаются, но в этом случае для каждой части молекулы время обновления различно. Например, время обновления фосфатной группы отличается от времени обновления 1-ацильной группы; это обусловлено наличием ферментов, вызывающих частичный гидролиз фосфолипидов, вслед за которым может снова происходить их синтез (рис. 25.4). **Фосфолипаза A_2** катализирует гидролиз эфирной связи в положении 2 глицерофосфолипидов, в результате чего образуются свободная жирная кислота и лизофосфолипид, который в свою очередь реацилируется ацил-СоА при участии ацилтрансферазы. В альтернативном варианте лизофосфолипид (например, лизолецитин) атакуется

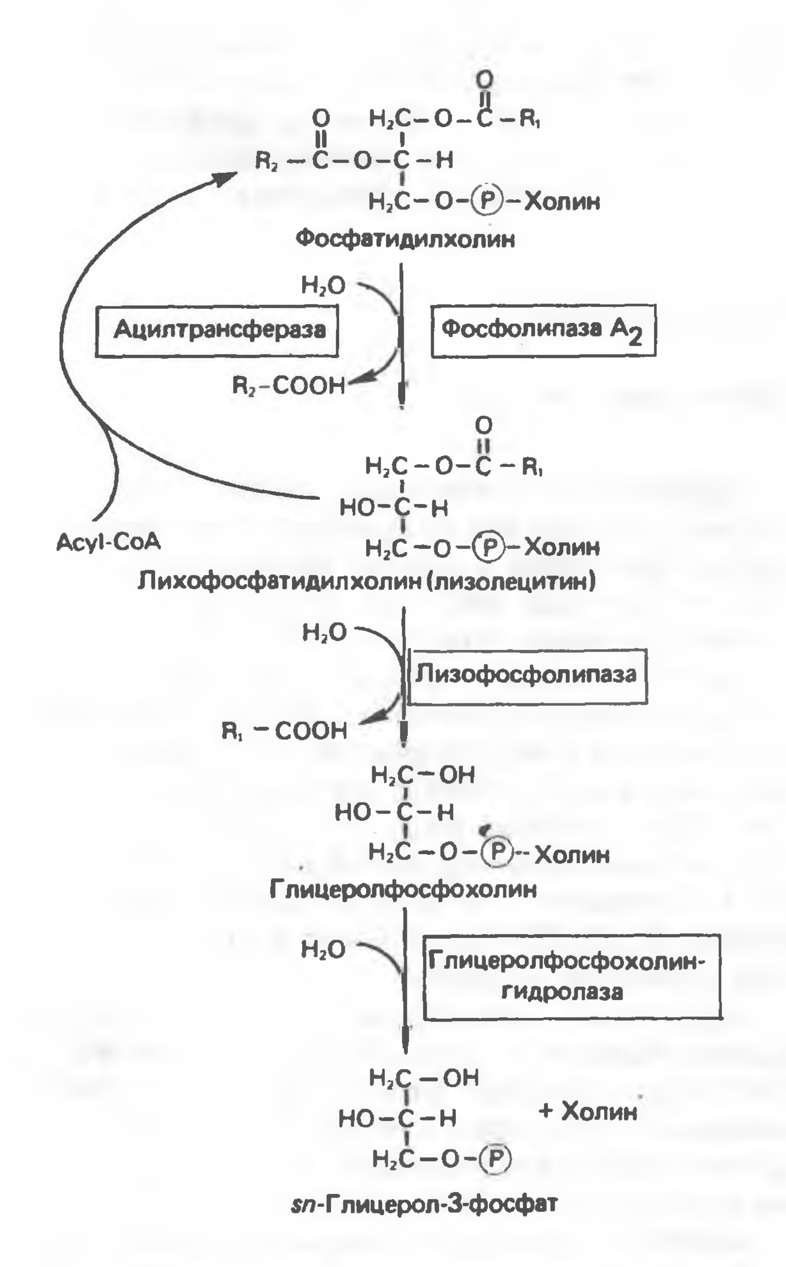


Рис. 25.4. Метаболизм фосфатидилхолина (лецитина).

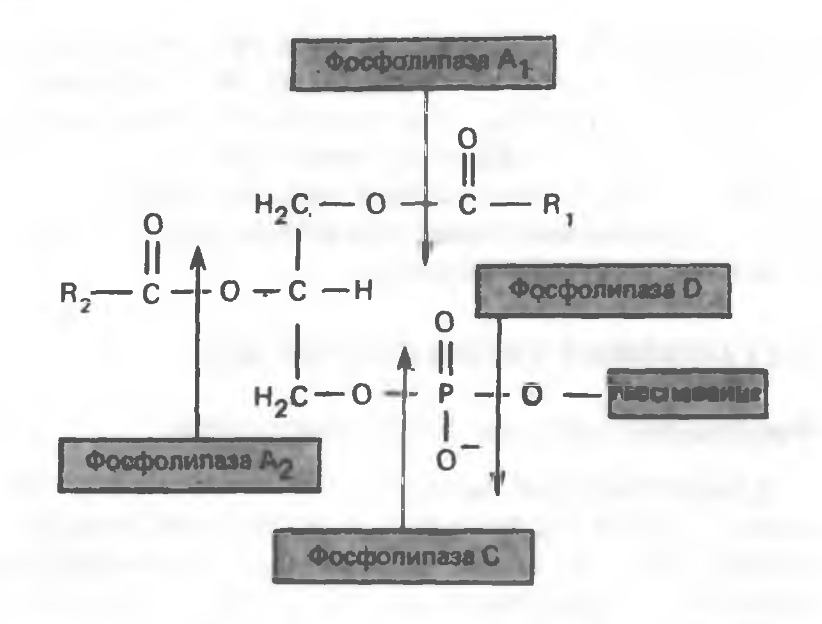
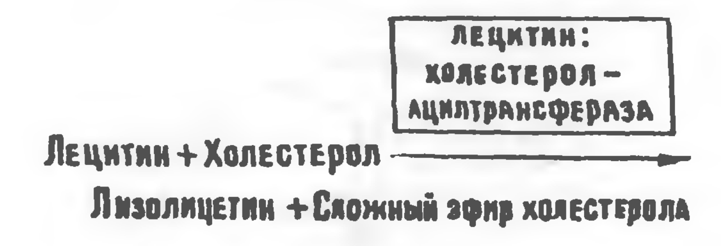


Рис. 25.5. Эфирные связи фосфолипидного субстрата, гидролизуемые фосфолипазами.

лизофосфолипазой (фосфолипазой В), при этом отщепляется оставшаяся 1-ацильная группа и образуется соответствующее глицеролфосфорильное основание. Последнее в свою очередь может расщепляться гидролазой до глицерол-3-фосфата и основания. **Фосфолипаза A_1** атакует эфирную связь фосфолипидов в положении 1 (рис. 25.5), а **фосфолипаза С** — в положении 3 (в последнем случае образуется 1,2-диацилглицерол и фосфорильное основание). Фосфолипаза С является одним из главных бактериальных токсинов. **Фосфолипаза D**, встречающаяся главным образом у растений, катализирует отщепление от фосфолипида азотистого основания.

Лизолецитин может синтезироваться по альтернативному пути с участием **лецитин: холестерол ацилтрансферазы (ЛХТА)**. Этот фермент, находящийся в плазме крови и образующийся в печени, катализирует перенос остатка жирной кислоты из положения 2 молекулы лецитина на холестерол, в результате образуется сложный эфир холестерола. Считается, что именно под действием ЛХТА синтезируется большая часть сложных эфиров холестерола — компонентов липопротеинов плазмы крови. Последствия **недостатка ЛХАТ** обсуждаются на с. 281.



В фосфолипидах длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты находятся главным образом в положении 1, в то время как полиненасыщенные жирные кислоты (например, предшественники простагландинов) — чаще всего в положении 2. Включение жирных кислот в молекулу лецитина происходит при

полном синтезе фосфолипида, при трансацилировании между эфиром холестерола и лизолецитином, а также при прямом ацилировании лизолецитина ацил-СоА. Таким образом может происходить постоянное обновление жирных кислот, особенно важным является **включение в молекулы фосфолипидов незаменимых жирных кислот**.

МЕТАБОЛИЗМ СФИНГОЛИПИДОВ

Фосфосфинголипиды (сфингомиелины)

Сфингомиелины представляют собой фосфолипиды, в состав которых входят жирная кислота, фосфатная группа, холин и сложный аминоспирт — сфингозин. Сфингомиелины не содержат глицерол.

Сфингозин (рис. 25.6) синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме. После активации путем взаимодействия с пиридоксальфосфатом аминокислота серин вступает в реакцию с пальмитоил-СоА;

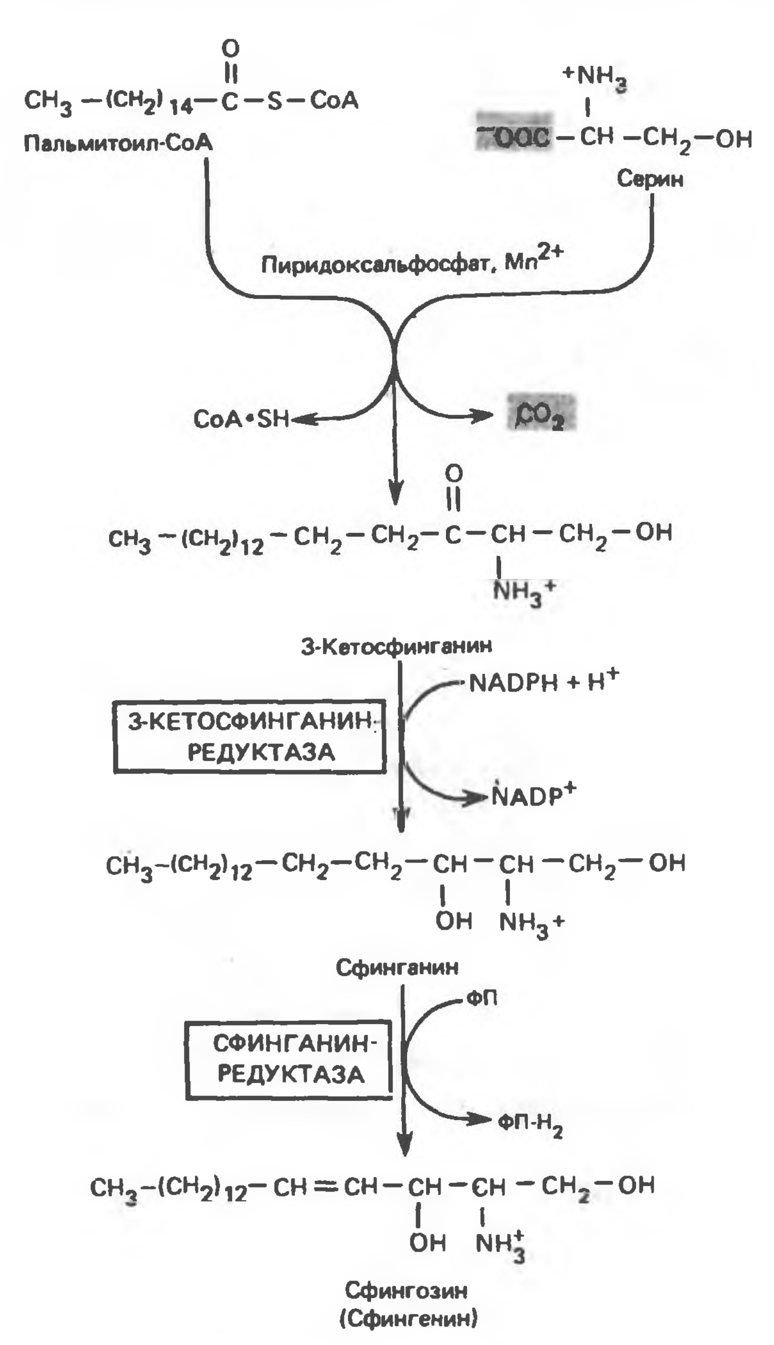


Рис. 25.6. Биосинтез сфингозина. ФП — флавопротеин.

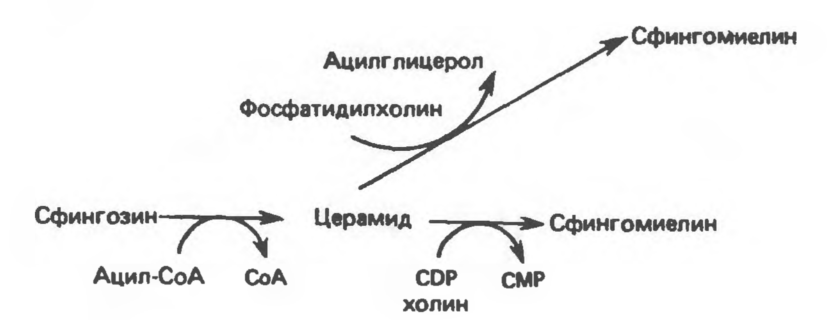


Рис. 25.7. Биосинтез церамида и сфингомиелина.

в результате этой реакции образуется 3-кетосфинганин и освобождается CO_2. Сфингозин образуется после двух окислительно-восстановительных реакций, первая из которых протекает с участием NADPH в качестве донора водорода, а вторая катализируется флавопротеинсодержащим ферментом, подобным ацил-СоА-дегидрогеназе, участвующей в β-окислении.

Церамид (N-ацилсфингозин) является интермедиатом в биосинтезе сфингомиелина и образуется при взаимодействии сфингозина с ацил-СоА (рис. 25.7). Ацильная группа чаще всего представлена длинноцепочечной насыщенной или моноеновой кислотой. **Сфингомиелин** образуется в результате реакции церамида с CDP-холином или фосфатидилхолином. В последнем случае реакция аналогична одной из реакций биосинтеза фосфатидилхолина (рис. 25.1).

ГЛИКОЛИПИДЫ

Гликосфинголипиды

Гликосфинголипиды представляют собой гликолипиды, в состав которых входит **церамид**, состоящий из сфингозина и остатка жирной кислоты (рис. 25.7), и один или несколько остатков сахаров. Во многих гликосфинголипидах обнаружены главным образом C_{24}-жирные кислоты, например в состав гликосфинголипидов мозга входят лигноцериновая, цереброновая и нервоновая кислоты. Лигноцериновая кислота ($C_{23}H_{47}COOH$) синтезируется из ацетил-СоА. Цереброновая кислота является 2-гидроксипроизводным лигноцериновой кислоты, из которой она и образуется. Мононенасыщенная нервоновая кислота ($C_{23}H_{45}COOH$) образуется путем удлинения цепи олеиновой кислоты.

Простейшие гликосфинголипиды — **галактозилцерамид (GalCer) и глюкозилцерамид (GlcCer)**. GalCer является главным липидом миелина, а GlcCer — основным гликосфинголипидом мембран клеток других тканей и предшественником большинства более сложных гликосфинголипидов.

Биосинтез гликосфинголипидов катализируется ферментным препаратом, полученным из мозга мо-

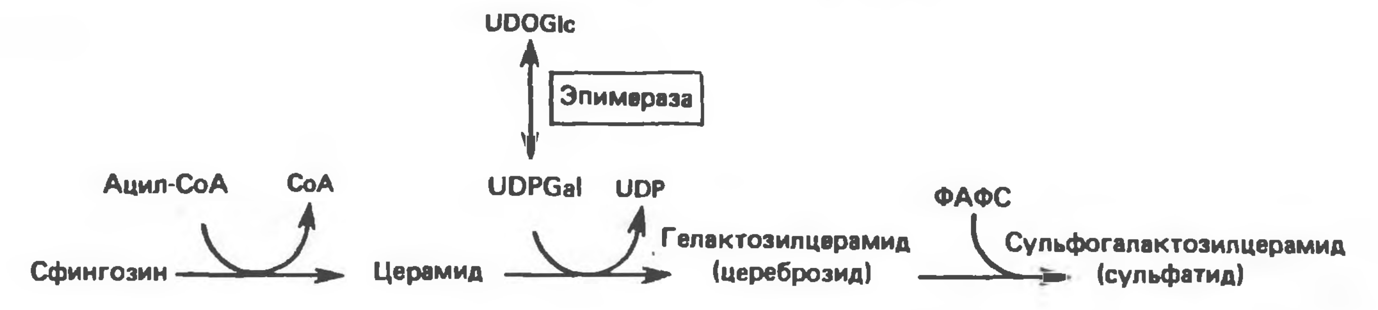


Рис. 25.8. Биосинтез галактозилцерамида и его сульфопроизводного. ФАФС – «активный сульфат», фосфоаденозин-5′-фосфосульфат.

лодых крыс (рис. 25.8). **Уридиндифосфогалактозоэпимераза**, использующая в качестве субстрата уридиндифосфатглюкозу (UDPGlc), катализирует эпимеризацию глюкозного фрагмента в галактозный; в результате образуется UDP-галактоза (UDPGal). Реакция, происходящая в мозгу, подобна соответствующей реакции, протекающей в печени и молочной железе (рис. 21.3). Галактозилцерамид синтезируется из церамида и UDPGal. **Сульфогалактозилцерамид** образуется в результате реакции галактозилцерамида с 3′-фосфоаденозин-5′-фосфосульфатом (ФАФС, «активный сульфат»). ФАФС участвует также в биосинтезе других сульфолипидов, а именно **сульфо(галакто)глицеролипидов** и **сульфостероидов**.

Ганглиозиды синтезируются из церамида путем последовательного присоединения активированных сахаров, поставляемых, например, UDPGlc и UDP-Gal, и одной из **сиаловых кислот**, как правило **N-ацетилнейраминовой кислоты** (рис. 25.9). Таким образом может образоваться большое число ганглиозидов с возрастающими молекулярными массами. Большинство ферментов, катализирующих перенос остатков сахаров от нуклеотидсахаров (гликозилтрансферазы), находятся в аппарате Гольджи.

Функции гликосфинголипидов. Гликосфинголипиды, являющиеся компонентами наружного слоя плазматической мембраны, могут участвовать в **межклеточных взаимодействиях и контактах**. Неко-

Рис. 25.9. Биосинтез ганглиозидов. NeuAc – N-ацетилнейраминовая кислота.

торые из них являются антигенами, например антиген Форссмана и вещества, определяющие группы крови системы АВО. Сходные олигосахаридные цепи обнаружены и у других гликопротеинов плазматической мембраны. Ряд ганглиозидов функционирует в качестве рецепторов бактериальных токсинов (например, холерного токсина, который запускает процесс активации аденилатциклазы).

ФОСФОЛИПИДЫ И СФИНГОЛИПИДЫ ПРИ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ (ЛИПИДОЗЫ)

Ряд заболеваний характеризуется накоплением избыточных количеств данных липидов в клетках, чаще всего в нервных. Эти заболевания можно разделить на 3 группы: 1) болезни, обусловленные

Таблица 25.1. Сфинголипидозы

Заболевание	Фермент, недостаточность которого обусловливает заболевание	Накапливающийся липид	Место действия фермента	Клинические симптомы
Фукозидоз	**α-Фукозидаза**	Cer—Glc—GalNAc—Cal ⋮ Fuc Н-Изоантиген		Слабоумие, спастическое состояние мышц, утолщение кожи
Генерализованный ганглиозидоз	G_{M1}-β-Галактозидаза	Cer—Glc—Gal(NeuAc)—GalNAc ⋮ Gal Ганглиозид G_{M1}		Умственная отсталость, увеличение печени, деформация скелета
Болезнь Тея—Сакса	Гексозаминидаза А	Cer—Glc—Gal-(NeuAc) ⋮ GalNAc Ганглиозигд G_{M2}		Умственная отсталость, слепота, мышечная слабость
Вариант болезни Тея—Сакса, или болезнь Сандхоффа	Гексозаминидазы А и В	Cer—Glc—Gal—Gal ⋮ GalNAc Глобозид + ганглиозид G_{M2}		Те же, что и в случае болезни Тея—Сакса, но развиваются быстрее
Болезнь Фабри	α-Галактозидаза	Cer—Glc—Gal ⋮ Gal Глоботриаозилцерамид		Кожная сыпь, почечная недостаточность (сильно выражена только у мужчин); рецессивный генетический признак, связан с Х-хромосомой
Церамидлактозидлипидоз	Церамидлактозидаза (β-галактозидаза)	Cer—Glc ⋮ Gal Церамидлактозид		Прогрессирующее поражение мозга, увеличение печени и селезенки
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза	Cer—Gal ⋮ OSO_3 3-Сульфогалактозилцерамид		Умственная отсталость и психические нарушения у взрослых; демиелинизация
Болезнь Краббе	β-Галактозидаза	Cer ⋮ Gal Галактозилцерамид		Умственная отсталость, почти полное отсутствие миелина
Болезнь Коше	β-Глюкозидаза	Cer ⋮ Glc Глюкозилцерамид		Увеличение печени и селезенки, эрозия трубчатых костей, умственная отсталость у детей
Болезнь Нимана—Пика	Сфингомиелиназа	Cer ⋮ P — холин Сфингомиелин		Увеличение печени и селезенки, умственная отсталость; фатальна в раннем возрасте
Болезнь Фарбера	Церамидаза	Ацил ⋮ Сфингозин Церамид		Хрипота, дерматит, деформация скелета, умственная отсталость; фатальна в раннем возрасте

NeuAc — N-ацетилнейраминовая кислота; Cer — церамид; Glc — глюкоза; Gal — галактоза; Fuc — фукоза.

истинной демиелинизацией нервных волокон, 2) сфинголипидозы, 3) лейкодистрофии.

При **рассеянном склерозе**, который относится к первой группе заболеваний, наблюдается уменьшение содержания как фосфолипидов (в частности, этаноламинплазмалогена), так и сфинголипидов в белом веществе мозга; в результате белое вещество по составу становится похожим на серое. В белом веществе обнаруживаются эфиры холестерола, отсутствующие в норме, а спинномозговая жидкость характеризуется повышенным содержанием фосфолипидов.

Сфинголипидозами называют группу наследственных заболеваний, проявляющихся чаще всего в детском возрасте. Эти заболевания относятся к большой группе лизосомных болезней (Neufeld, Lim, Shapiro, 1975).

Болезни накопления липидов характеризуются рядом постоянных признаков: 1) в тканях накапливаются сложные липиды, структурным компонентом которых является **церамид**; 2) скорость **синтеза** запасаемого липида сравнима со скоростью его биосинтеза у здоровых людей; 3) при этих заболеваниях наблюдается **недостаток специфичного фермента в лизосомах, необходимого для гидролиза липида**; 4) степень снижения активности фермента во всех тканях одинакова. С учетом всех вышеизложенных признаков были разработаны специальные методы диагностики данных заболеваний. Стало возможным также выявлять гетерозиготных носителей дефектных генов, ответственных за развитие этих заболеваний, и определять сфинголиподистрофию у плода. Данные об основных липидозах приведены в табл. 25.1.

Множественная недостаточность сульфатаз приводит к накоплению сульфогалактозилцерамида, сульфостероидов и протеогликанов из-за одновременного недостатка ацилсульфатаз А, В, С и стероидсульфатазы.

ЛИТЕРАТУРА

Bell R. M.,Coleman R. A. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes, Ann. Rev. Biochem., 1980, **49**, 459.

Boyer P. D. (ed.) The Enzymes, 3rd ed. Vol. 16, Lipid Enzymology, Academic Press, 1983.

Brady R. O. Sphingolipidoses, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 687.

Hanahan D. J. Platelet-activsting factor, Ann. Rev. Biochem., 1986, **55**, 483.

Hawthorne J. N., Ansell G. B. (eds). Phospolipids, Elsevier, 1982.

Neufeld E. F., Lim T. W., Shapiro L. J. Inherited disorders of lysosomal metabolism, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 357.

Various authors: Disorders characterized by evidence of abnormal lipid metabolism. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed. Stanbury J. B. et al. (eds). McGraw-Hill, 1983.

Various authors: Metabolism of triacylglycerols; phospholipid metabolism; ether-linked glycerolipids; sphingolipids. In: Biochemistry of Lipids and Hormones. Vance D. E., Vance J. E. (eds). Benjamin/Cummings, 1985.

Глава 26

Транспорт и запасание липидов

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Жиры, попадающие в организм с пищей, и липиды, синтезируемые в печени и жировой ткани, должны транспортироваться в другие ткани и органы, где они либо используются, либо запасаются. Поскольку липиды нерастворимы в воде, возникает проблема их транспорта в водной среде (плазме крови); она решается путем взаимодействия неполярных липидов (триацилглицеролов и эфиров холестерола) с амфипатическими липидами (фосфолипидами и холестеролом) и белками, в результате образуются смешивающиеся с водой липопротеины.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

У всеядных животных и у человека в анаболической фазе пищевого цикла в организм поступает избыточное количество калорий. Затем следует период отрицательного калорического баланса, во время которого расходуются созданные ранее запасы углеводов и жиров. Связующим звеном рассматриваемого цикла являются липопротеины: они осуществляют транспорт липидов из кишечника в составе хиломикронов, а из печени в составе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в различные ткани, где они окисляются (и в жировую ткань, где они откладываются про запас). Из жировой ткани липиды мобилизуются в виде свободных жирных кислот, которые поступают в кровь и связываются с сывороточным альбумином. Нарушения липидного обмена происходят на стадиях образования или утилизации липопротеинов, в результате чего развиваются различные формы гипо- и гиперлипопротеинемии. Наиболее распространенным заболеванием является сахарный диабет, при котором недостаток инсулина вызывает избыточную мобилизацию свободных жирных кислот и снижение утилизации хиломикронов и ЛПОНП, в результате чего развивается гипертриацилглицеролемия. Большинство других форм патологии, сопровождающихся нарушениями липидного обмена, связаны главным образом с наследственными нарушениями синтеза апопротеиновой части липопротеинов, а также синтеза ключевых ферментов или рецепторов липопротеинов. Некоторые из этих наследственных дефектов являются причиной гиперхолестеролемии и раннего атеросклероза. Избыточное накопление жиров приводит к ожирению, одна из форм которого возникает из-за нарушения термогенеза в бурой жировой ткани при неправильном питании.

ЛИПИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛИПОПРОТЕИНЫ

Состав

Экстракция липидов плазмы крови соответствующим растворителем и последующее фракционирование полученного экстракта показали, что в плазме крови содержатся **триацилглицеролы, фосфолипиды, холестерол и эфиры холестерола**, а также небольшое количество неэстерифицированных длинноцепочечных жирных кислот (свободных жирных кислот), которые составляют менее 5% от общего количества жирных кислот, находящихся в плазме. **Свободные жирные кислоты** (СЖК) являются метаболически наиболее активными липидами плазмы. Основные классы липидов, обнаруженные в плазме крови, приведены в табл. 26.1.

Чистый жир имеет меньшую плотность, чем вода, следовательно, чем выше соотношение липида и белка в липопротеинах, тем ниже их плотность (табл. 26.2). Это обстоятельство лежит в основе разделения липопротеинов плазмы крови методом **ультрацентрифугирования**. Скорость всплывания каждого липопротеина в растворе NaCl (удельный вес 1,063) может быть выражена в единицах флотации Сведберга (Sf). Одна единица Sf равна 10^{-13} см/с на 1 дин/г при 26° С. В табл. 26.2 приведен состав различных фракций липопротеинов, полученных в результате центрифугирования плазмы. Различные классы липидов присутствуют в большинстве фракций. Поскольку фракции представляют собой физиологические компоненты плазмы, то общий химический ана-

Таблица 26.1. Липиды плазмы крови человека

Липиды	мг/100 мл	
	В среднем	Пределы колебаний
Общее количество	570	360—820
Триацилглицеролы	142	80—180 [1]
Общее количество фосфолипидов [2]	·215	123—390
Фосфатидилхолин		50—200
Фосфатидилэтаноламин		50—130
Сфингомиелины		15—35
Общее количество холестерола	200	107—320
Свободный холестерол (неэстерифицированный)	55	26—106
Свободные жирные кислоты (неэстерифицированные)	12	6—16 [1]

Общее количество жирных кислот (в расчете на стеариновую кислоту) колеблется от 200 до 800 мг/100 мл, из них 45% — в составе триацилглицеролов, 35% — в составе фосфолипидов, 15% — эфиры холестерола и менее 5% — свободные жирные кислоты

[1] Колеблется в зависимости от характера питания.

[2] Определяли содержание фосфора. Фосфор липидов × 25 = фосфолипид в виде фосфатидилхолина (4% фосфора).

Плотность
–
Старт
<0.96
Хиломикроны
1.006 – 1.063 (ЛПНП)
β-Липопротеины
< 1.006 (ЛПОВП)
Пре-β-липопротеины
1.063 – 1.21 (ЛПВП)
α-Липопротеины
+

Рис. 26.1. Разделение липопротеинов плазмы крови методом электрофореза.

Таблица 26.2. Состав липопротеинов плазмы крови человека

Фракция	Источник	Диаметр, нм	Плотность	Скорость флотации Sf	Состав						
					Содержание белка, %	Общее содержание липидов, %	Процент от содержания липидов				
							Триацилглицерол	Фосфолипид	Эфир холестерола	Холестерол (свободный)	Свободные жирные кислоты
Хиломикроны	Кишечник	100—1000	< 0,96	> 400	1—2	98—99	88	8	3	1	...
Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП)	Печень и кишечник	30—90	0,96—1,006	20—400	7—10	90—93	56	20	15	8	1
Липопротеины средней плотности (ЛПСП)	ЛПОНП и хиломикроны	25—30	1,006—1,019	12—20	11	89	29	26	34	9	1
Липопротеины низкой плотности (ЛПНП)		20—25	1,019—1,063	2—12	21	79	13	28	48	10	1
Липопротеины высокой плотности (ЛПВП)											
ЛПВП₂	ЛПОНП из печени и кишечника?	10—20	1,063—1,125		33	67	16	43	31	10	...
ЛПВП₃	Хиломикроны?	7,5—10	1,125—1,210		57	43	13	46	29	6	6
Альбумин-СЖК	Жировая ткань		> 1,2810		99	1	0	0	0	0	100

СЖК — свободные жирные кислоты, ЛПОВП (липопротеины очень высокой плотности) являются минорной фракцией, имеющей плотность 1,21—1,25.

лиз последней на содержание различных липидов (за исключением СЖК) дает незначительную информацию.

Наряду с методами, основанными на различной плотности, липопротеины можно разделить также методом электрофореза (рис. 26.1) и более точно идентифицировать методом иммуноэлектрофореза. Помимо СЖК выделено 4 главные группы **липопротеинов, важных в физиологическом отношении и при постановке клинического диагноза**: 1) **хиломикроны**, образующиеся в кишечнике при всасывании триацилглицерола; 2) **липопротеины очень низкой плотности** (ЛПОНП или пре-β-липопротеины), которые образуются в печени и используются для экспорта триацилглицерола; 3) **липопротеины низкой плотности** (ЛПНП или β-липопротеины), представляющие собой конечную стадию катаболизма ЛПОНП; 4) **липопротеины высокой плотности** (ЛПВП или α-липопротеины), участвующие в метаболизме ЛПОНП и хиломикронов, а также холестерола. Основным липидом хиломикронов и ЛПОНП является триацилглицерол, в то время как преобладающими липидами ЛПНП и ЛПВП являются соответственно холестерол и фосфолипиды (табл. 26.2).

Структура

Белковая часть липопротеинов называется **аполипопротеином** или **апобелком**, в некоторых ЛПВП на ее долю приходится около 60%, а в хиломикронах — всего 1%.

Типичный липопротеин, например хиломикрон или ЛПОНП, состоит из **липидного ядра** (образованного в основном **неполярными триацилглицеролами и эфирами холестерола**) и наружного слоя, состоящего из более полярных **фосфолипидов, холестерола и апобелков**. Некоторые апобелки являются интегральной частью липопротеина и постоянно входят в его состав, в то время как другие могут переноситься на другие липопротеины (рис. 26.2).

Аполипопротеины (апобелки)

В состав липопротеинов входят один или несколько белков или полипептидов, которые называют апобелками. Эти белки обозначают буквами латинского алфавита (ABC). Так, два главных апобелка ЛПВП обозначаются A-I и A-II. Основным апобелком ЛПНП является апобелок B, он является также

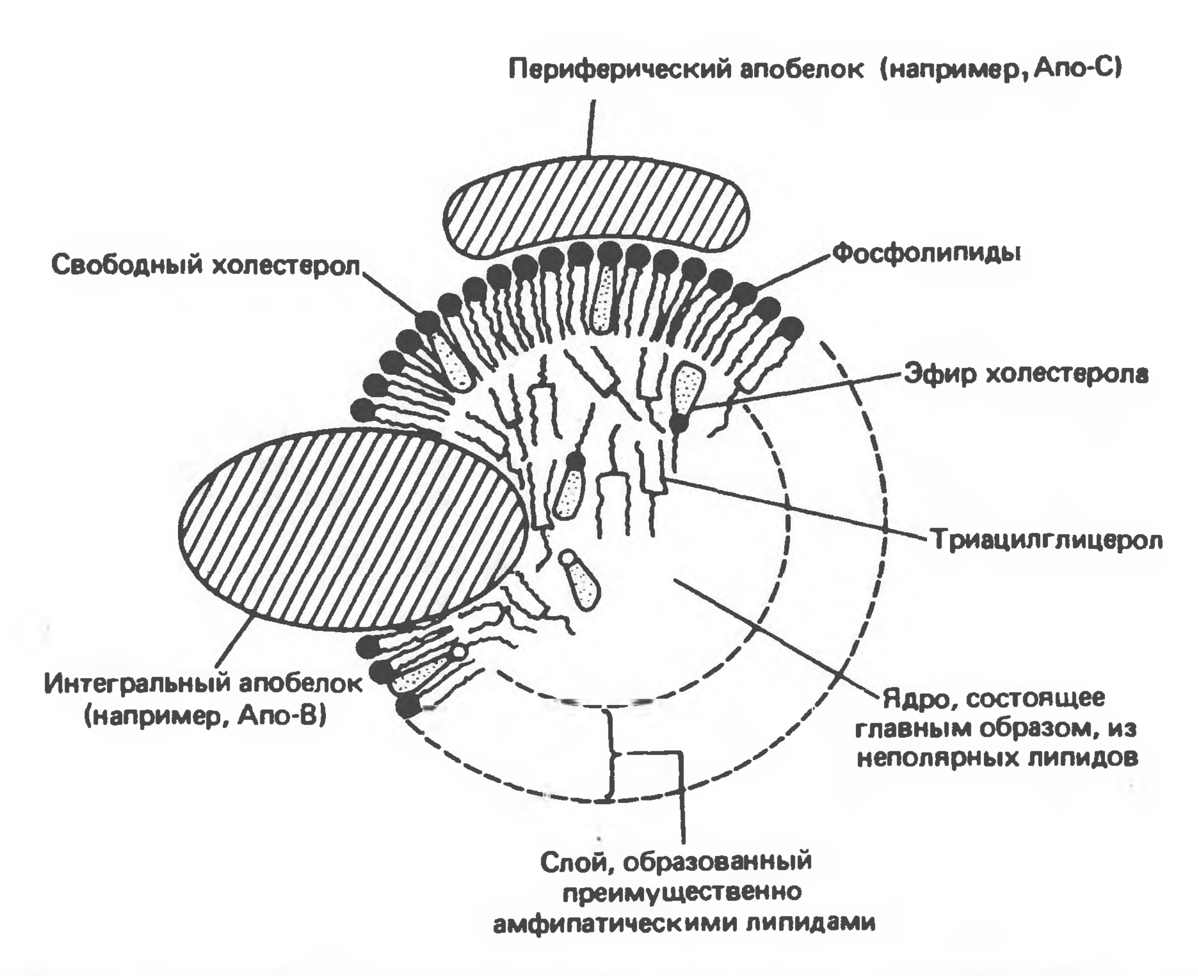


Рис. 26.2. Схема строения липопротеина плазмы крови. Следует отметить сходство со структурой плазматической мембраны. Получены данные, согласно которым некоторое количество триацилглицеролов и эфиров холестерола содержится в поверхностном слое, а во внутренней области имеется свободный холестерол.

Таблица 26.3. Апобелки липопротеинов плазмы крови человека

Апобелки	Липопротеины	Молекулярная масса	Примечания
A-I	ЛПВП, хиломикроны	28 300	Активатор фермента лецитин: холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ)
A-II	ЛПВП, хиломикроны	17 400	Образованы двумя идентичными мономерами, соединенными дисульфидным мостиком
B-100	ЛПНП ЛПОНП, ЛПСП	350 000	Синтезируется в печени
B-48	Хиломикроны, остатки хиломикронов	200 000	Синтезируется в кишечнике
C-I	ЛПОНП, ЛПВП	7 000	Возможный активатор ЛХАТ
C-II	ЛПОНП, ЛПВП, хиломикроны	8 800	Активатор внепеченочной липопротеинлипазы
C-III	ЛПОНП, ЛПВП, хиломикроны	8 750	Несколько полиморфных форм в зависимости от содержания сиаловой кислоты
D	Субфракция ЛПВП	32 500	Возможно, идентичен белку — переносчику эфиров холестерола
E (богатый аргинином)	ЛПОНП, ЛПВП, хиломикроны, остатки хиломикронов	34 000	Присутствует в избытке в β-ЛПНОП у людей, страдающих гиперлипопротеинемией типа III. Это единственный апобелок, обнаруженный в ЛПВП животных, у которых с помощью специальной диеты была индуцирована гиперхолестеролемия

компонентом ЛПОНП и хиломикронов. Однако апобелок B хиломикронов (B-48) меньше, чем апобелок B в ЛПНП или ЛПОНП (B-100), и имеет другой аминокислотный состав. B-48 синтезируется в кишечнике, а B-100 — в печени. (У крыс в печени, по-видимому, образуется как B-100, так и B-48.) Апобелки C-I, C-II, C-III представляют собой небольшие полипептиды, которые могут свободно переходить от одного липопротеина к другому (табл. 26.3). В состав углеводов, на долю которых приходится примерно 5% апобелка B, входят манноза, галактоза, фукоза, глюкоза, глюкозамин и сиаловая кислота. Таким образом, некоторые липопротеины являются также гликопротеинами. C-II является важным активатором внепеченочной липопротеинлипазы и участвует в освобождении кровотока от триацилглицеролов. A-I в ЛПВП является активатором лецитин:холестерол-ацилтрансферазы плазмы крови, благодаря действию которой происходит в основном образование эфиров холестерола у человека.

Помимо апобелков A, B и C в липопротеинах плазмы крови было идентифицировано еще несколько апобелков. Одним из них является выделенный из ЛПОНП апобелок E (10% от общего количества аминокислот в нем составляет аргинин), на долю которого в норме приходится 5—10% от общего количества апобелков ЛПОНП. Содержание апобелка E в широкой фракции β-ЛПОНП при электрофорезе возрастает у больных гиперлипопротеинемией типа III.

МЕТАБОЛИЗМ ЛИПОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

СВОБОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ (СЖК)

Свободные жирные кислоты (неэстерифицированные жирные кислоты) поступают в плазму крови в результате липолиза триацилглицеролов, катализируемого липазой в жировой ткани, или образуются при действии липопротеинлипазы на триацилглицеролы плазмы крови в период перехода их в ткани. В плазме крови СЖК **связаны с сывороточным альбумином**, и их концентрация варьирует от 0,1 до 2 мкэкв·мл$^{-1}$ плазмы. Они представлены в основном длинноцепочечными жирными кислотами, характерными для жировой ткани (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, пальмитолеиновой, линолевой и другими полиненасыщенными кислотами), и в меньшей степени другими длинноцепочечными жирными кислотами. У альбумина имеются участки связывания жирных кислот, обладающие к ним различным сродством. Отмечено, что при полноценном питании концентрация свободных жирных кислот в крови сравнительно низкая. Она возрастает приблизительно до 0,5 мкэкв·мл$^{-1}$ после всасывания питательных веществ в кишечнике, а при голодании составляет 0,7—0,8 мкэкв·мл$^{-1}$. В случае неконтроли-

руемого **сахарного диабета** уровень жирных кислот в плазме крови возрастает до 2 мкэкв·мл$^{-1}$.

У большинства животных уровень свободных жирных кислот в плазме сразу после приема пищи снижается, а затем вновь возрастает, в то время как у жвачных, у которых питательные вещества непрерывно поступают из кишечника, концентрация свободных жирных кислот в плазме крови постоянно находится на низком уровне.

Свободные жирные кислоты очень быстро удаляются из крови. Предполагается, что при голодании за счет окисления свободных жирных кислот поставляется приблизительно 25—50% энергии, необходимой для поддержания жизнедеятельности организма. Часть свободных жирных кислот подвергается эстерификации и, как показал радиоизотопный анализ, в конечном счете вновь вступают в цикл превращений. Величина дыхательного коэффициента при голодании свидетельствует о том, что количество жиров, подвергающихся расщеплению, значительно превышает количество окисляемых свободных жирных кислот; это объясняется окислением эстерифицированных липидов, поступающих из плазмы крови или находящихся в различных тканях. Окисление липидов характерно, как считают, для ткани сердца и скелетных мышц (в последних были обнаружены значительные запасы липидов). **Существует прямая связь между скоростью обновления свободных жирных кислот и их концентрацией в крови**.

Концентрация свободных жирных кислот плазмы крови регулируется скоростью их образования в жировой ткани, а поступление свободных жирных кислот в другие ткани зависит от их концентрации в плазме крови. Доля свободных жирных кислот, поглощаемых определенными тканями, по-видимому, существенно не зависит от уровня питания. Последний, однако, влияет на соотношение количества окисляемых и эстерифицируемых жирных кислот. Так, при голодании окисляется большая доля свободных кислот, чем при нормальном питании.

В цитозоле клеток многих тканей обнаружен **белок, связывающий жирные кислоты**, который получил название **Z-белок**. Полагают, что подобно сывороточному альбумину, осуществляющему внеклеточный транспорт длинноцепочечных жирных кислот, Z-белок обеспечивает их внутриклеточный транспорт.

ОБРАЗОВАНИЕ ХИЛОМИКРОНОВ И ЛИПОПРОТЕИНОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ (ЛПОНП)

По определению **хиломикроны** находятся в **хилусе** (млечном соке), образующемся только в лимфатической системе **кишечных ворсинок**. Хилус содержит также более мелкие и более плотные частички, которые имеют такие же физические характеристики, как и ЛПОНП. Однако апобелок этих частичек по составу напоминает скорее апобелок хиломикронов, чем ЛПОНП, поэтому их следует рассматривать как малые хиломикроны. Хиломикроны образуются даже при голодании, они осуществляют перенос 50% триацилглицеролов и холестерола лимфы; источником липидов, необходимых для их образования, являются в основном желчь и секрет кишечника. В то же время при всасывании триацилглицеролов после приема пищи количество хиломикронов возрастает. Большинство ЛПОНП плазмы крови образуется в печени, они осуществляют перенос **триацилглицеролов из печени в другие ткани**.

Механизмы образования хиломикронов в клетках кишечника и ЛПОНП в паренхиматозных клетках печени имеют много общего (рис. 26.3). Апопротеин В синтезируется рибосомами в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и встраивается в липопротеины в гладком эндоплазматическом ретикулуме, который является основным местом синтеза триацилглицеролов. Затем липопротеины проходят через аппарат Гольджи, где, как считают, происходит присоединение углеводных остатков к молекуле липопротеина. Хиломикроны и ЛПОНП высвобождаются из клеток кишечника и печени при слиянии секреторной вакуоли с клеточной мембраной (обратный пиноцитоз). Из клеток кишечника хиломикроны поступают в межклеточное пространство, а затем в лимфатические сосуды кишечных ворсинок — лактеали и уносятся вместе с лимфой. ЛПОНП секретируются паренхиматозными клетками печени сначала в пространство Диссе, а затем через щели между эндотелиальными клетками в синусоидные капилляры печени. Сходство механизмов образования хиломикронов и ЛПОНП поразительно; не считая клеток молочной железы, только клетки кишечника и печени способны секретировать эмульгированные липиды. То обстоятельство, что липопротеины, имеющие размеры хиломикронов и ЛПОНП, не могут проходить через эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, если только не подвергнутся гидролизу, по-видимому, и является причиной того, что жиры, входящие в состав пищи, поступают из кишечника в кровоток по лимфатическим путям (грудной проток), а не через систему воротной вены.

Выделенные из крови хиломикроны и ЛПОНП содержат апобелки С и Е, в то же время секретируемые (новообразованные) липопротеины содержат очень незначительное количество этих апобелков или же вообще их не содержат. По-видимому, апобелки С и Е из ЛПВП переносятся на хиломикроны и ЛПОНП после того, как они поступают в кровоток (рис. 26.4 и 26.5). Факторы, регулирующие секрецию ЛПОНП клетками печени, более подробно описаны ниже.

А

Просвет кишечника

ШЭР

Г

ГЭР

Х

Я

Кровеносный капилляр

Лимфатический сосуд, ведущий к грудному протоку

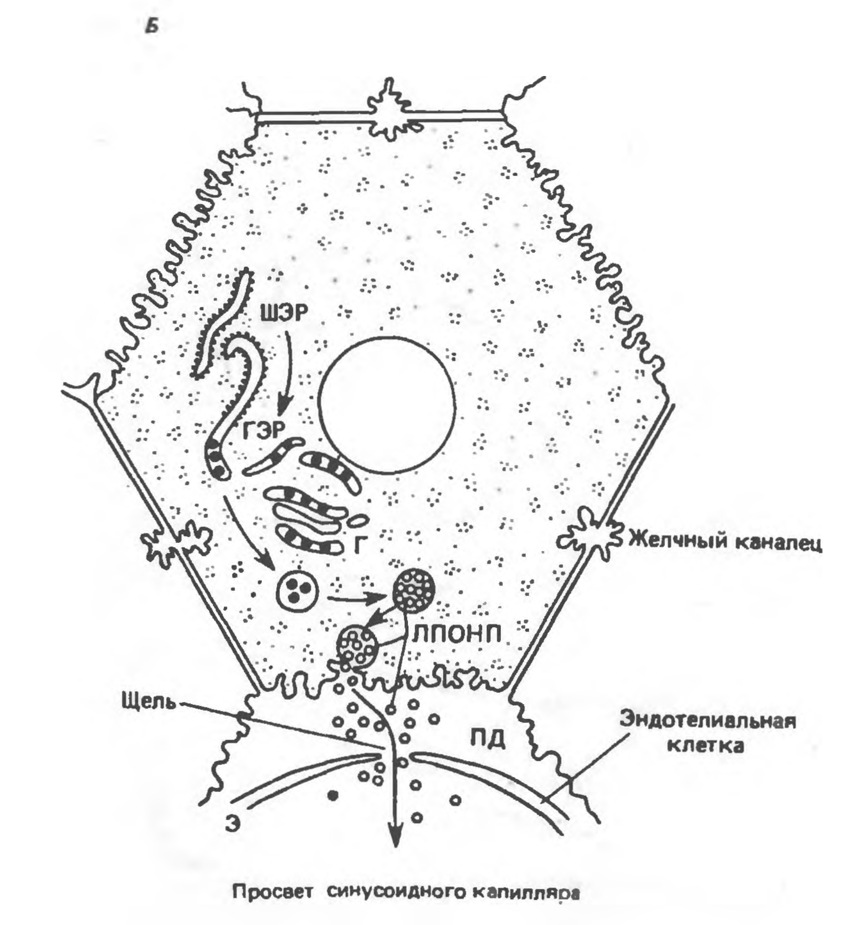


Рис. 26.3. Образование и секреция (*А*) хиломикронов клеткой кишечника и (*Б*) липопротеинов очень низкой плотности клеткой печени. ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум; ГЭР — гладкий эндоплазматический ретикулум; Г — аппарат Гольджи; Я — ядро; Х — хиломикрон; ЛПОНП — липопротеин очень низкой плотности; Э — эндотелий; ПД — пространство Диссе, заполненное плазмой крови. На рисунке схематично представлена последовательность процессов, которые можно зарегистрировать с помощью электронного микроскопа.

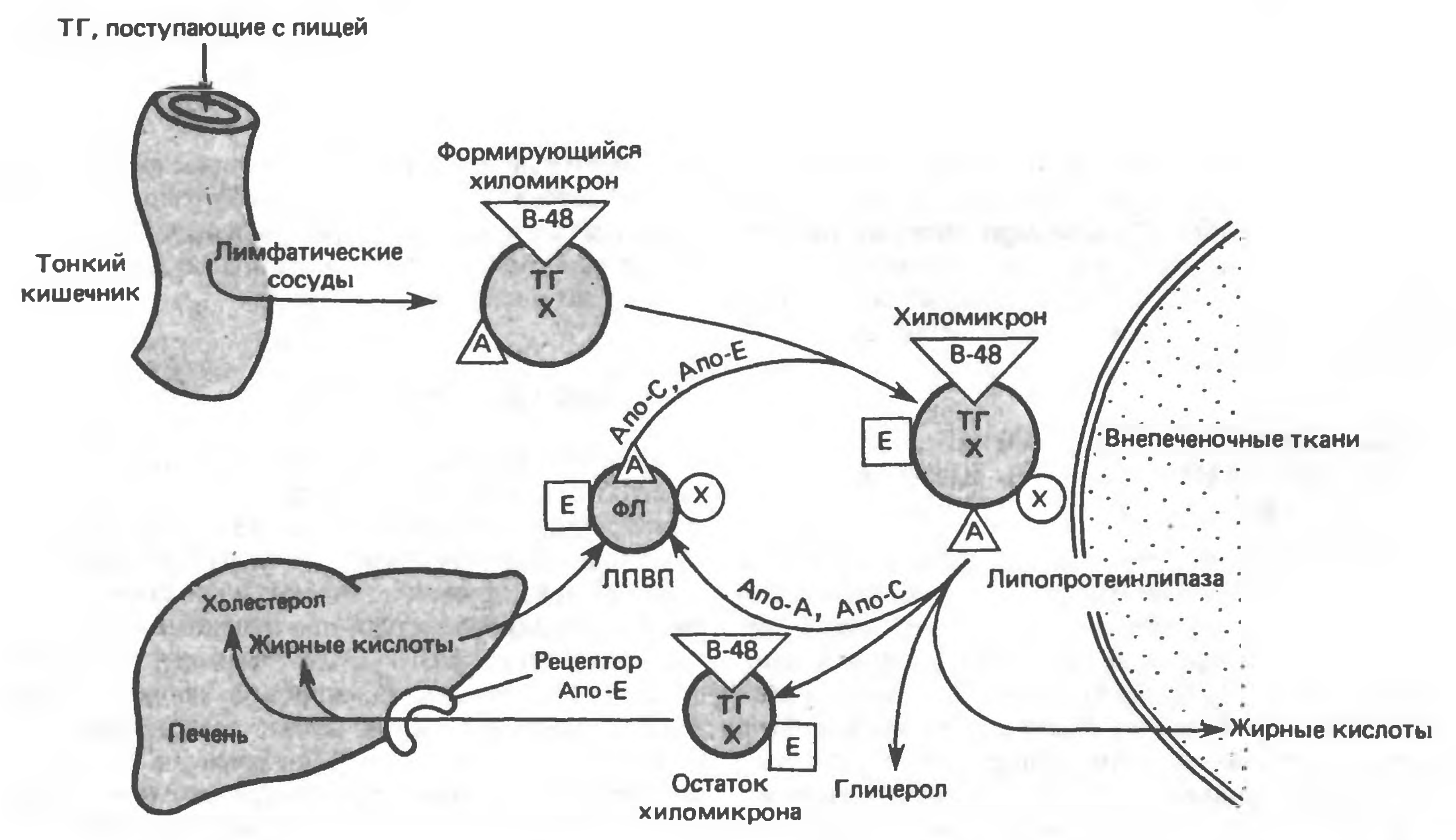


Рис. 26.4. Метаболическая судьба хиломикронов. Апо-А — апобелок А; Апо-В — апобелок В; Апо-С — апобелок С; Апо-Е — апобелок Е; ЛПВП — липопротеин высокой плотности; ТГ — триацилглицерол; Х — холестерол и его эфиры; ФЛ — фосфолипид. Указаны только преобладающие липиды.

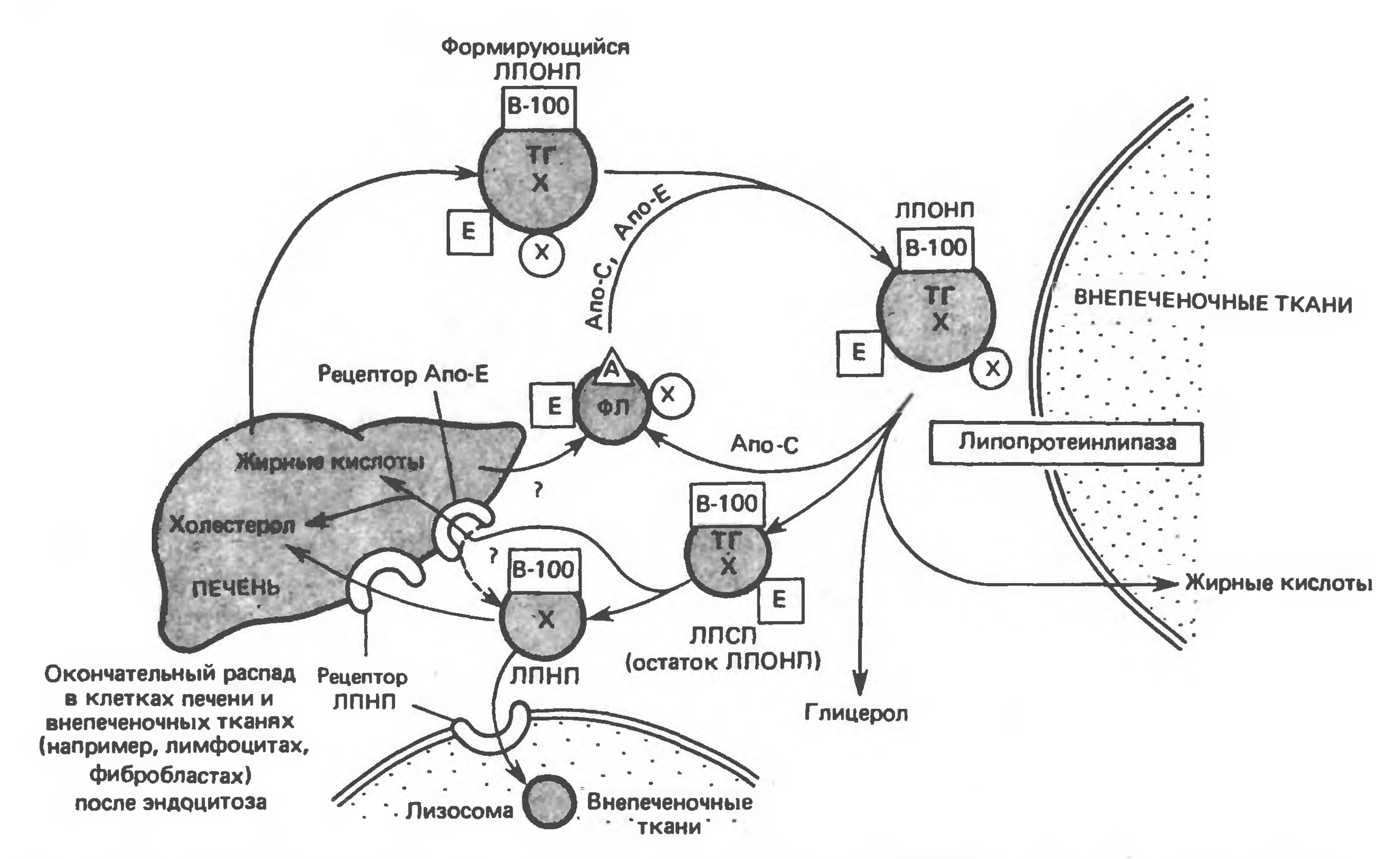


Рис. 26.5. Метаболическая судьба липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и образование липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Апо-А — апобелок А; Апо-В — апобелок В; Апо-С — апобелок С; Апо-Е — апобелок Е; ЛПВП — липопротеин высокой плотности; ТГ — триацилглицерол; ЛПСП — липопротеин средней плотности; Х — холестерол и его эфиры; ФЛ — фосфолипид. Указаны только преобладающие липиды. Существуют разногласия по поводу того, каким путем ЛПСП поступают в клетки печени: при участии рецепторов апобелка Е или рецепторов ЛПНП.

Необходимым компонентом при образовании хиломикронов и ЛПОНП является апобелок В. При редком заболевании **абеталипопротеинемии** апопротеин В не синтезируется и соответственно не образуются липопротеины, в состав которых входит этот апобелок; в результате в клетках кишечника и печени накапливаются «капельки» липидов.

КАТАБОЛИЗМ ХИЛОМИКРОНОВ И ЛИПОПРОТЕИНОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Меченые хиломикроны быстро исчезают из крови. У мелких животных (например, крыс) период полувыведения хиломикронов составляет всего несколько минут; у крупных животных, а также у человека он больше, но не превышает 1 ч. Более крупные частицы катаболизируют быстрее, чем мелкие. При внутривенном введении хиломикронов, содержащих меченые по жирным кислотам триацилглицеролы, около 80% метки обнаруживается в жировой ткани, сердце и мышцах и примерно 20% в печени. Поскольку методом перфузии было показано, что **лишь незначительные количества нативных хиломикронов и ЛПОНП подвергаются катаболическим превращениям в печени**, то метка, обнаруживаемая в ней, должна иметь вторичное происхождение, т. е. она обусловлена метаболическими превращениями хиломикронов во внепеченочных тканях.

Роль липопротеинлипазы

Имеется выраженная корреляция между способностью ткани включать жирные кислоты триацилглицеролов, находящихся в составе липопротеинов, и активностью фермента **липопротеинлипазы**. Последний локализован на **стенках капилляров**, к которым он «прикрепляется» протеогликановыми цепями гепарансульфата. Этот фермент обнаружен в экстрактах из сердца, жировой ткани, селезенки, легких, мозгового слоя почек, аорты, диафрагмы и лактирующей молочной железы. Он практически отсутствует в крови, однако после **инъекции гепарина** гепарансульфатная связь перестает удерживать липопротеинлипазу и она поступает в кровяное русло, где катализирует гидролиз триацилглицеролов, находящихся в крови. При введении больших коли-

честв гепарина из печени высвобождается другая липаза (**гепарин-освобождаемая липаза печени**). Этот фермент по своим свойствам отличается от липопротеинлипазы и менее эффективно атакует хиломикроны. Роль этого фермента до конца не ясна, но показано, что он участвует в метаболизме ЛПВП$_2$ в печени (рис. 26.6) и в превращении остатков хиломикронов и ЛПОНП (см. ниже).

Как **фосфолипиды**, так и **апобелок С-II** являются кофакторами липопротеинлипазы. Аро-С-II имеет специфический участок связывания фосфолипидов, которым он присоединяется к липопротеину. Таким образом, хиломикроны и ЛПОНП обеспечивают фермент, катализирующий их метаболизм, как субстратом, так и кофакторами. Гидролиз триацилглицеролов происходит при контакте липопротеинов с ферментом, связанным с эндотелием. В процессе гидролиза триацилглицерол превращается сначала в диацилглицерол, а затем в моноацилглицерол, который расщепляется на свободную жирную кислоту и глицерол. Часть высвобождаемых жирных кислот поступает в кровоток, где они связываются сывороточным альбумином, а основная масса свободных жирных кислот транспортируется в ткани (рис. 24.6 и 24.5). Липопротеинлипаза сердца характеризуется низким значением $K_м$ по триацилглицеролу, а у липопротеинлипазы жировой ткани соответствующее значение $K_м$ на порядок выше. При переходе от сытого состояния к голодному концентрация триацилглицеролов в плазме крови уменьшается; при этом липопротеинлипаза сердца остается насыщенной субстратом, а насыщенность фермента жировой ткани снижается; это приводит к **перераспределению потребления субстрата в пользу ткани сердца**. Подобное перераспределение наблюдается также в период лактации, во время которого активность фермента в жи-

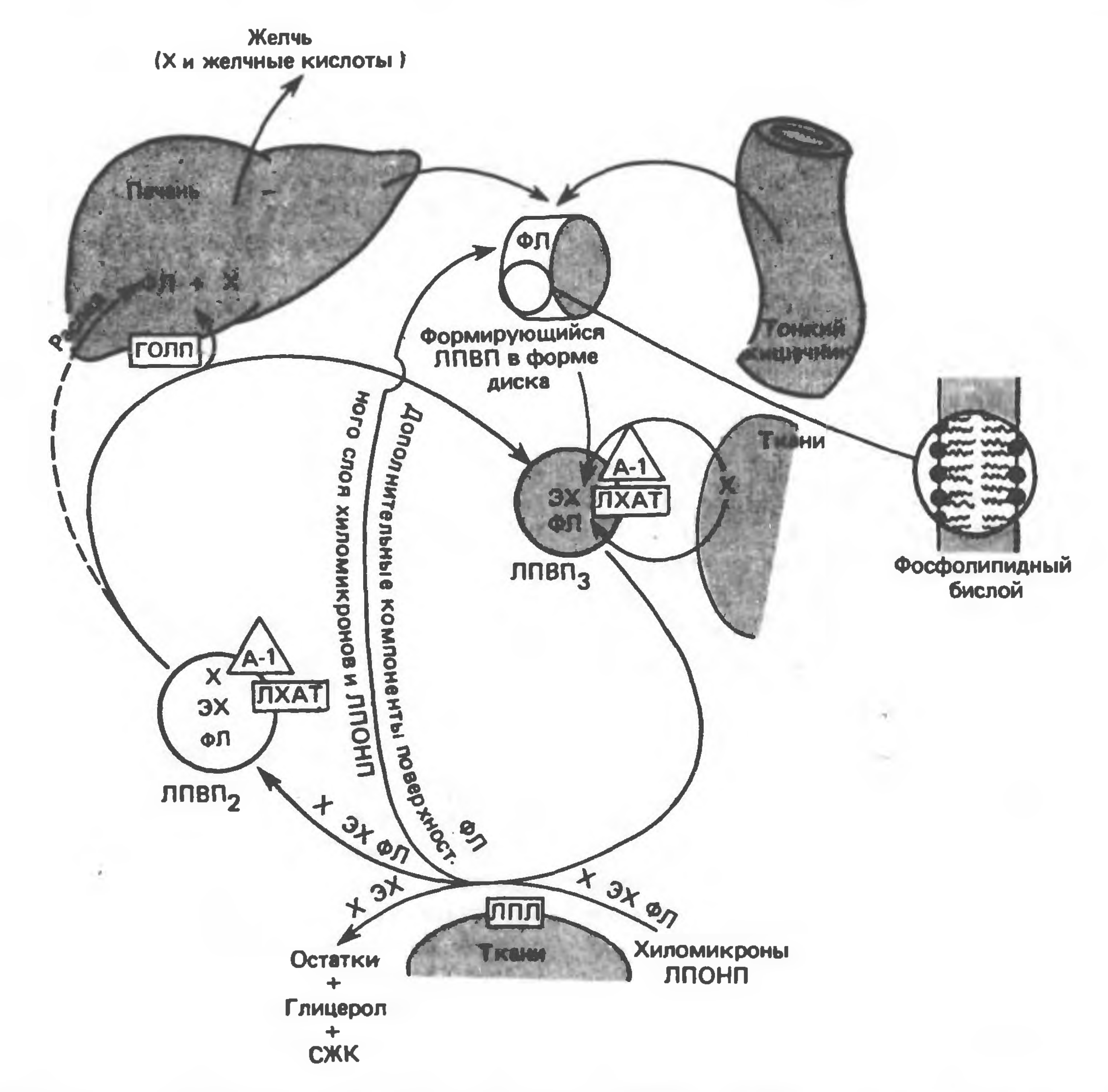


Рис. 26.6. Метаболизм липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). ГОЛП — гепарин-осаждаемая липаза печени; ЛХАТ — лецитин: холестеролацилтрансфераза; ЛПЛ — липопротеинлипаза; Х — холестерол; ХЭ — эфир холестерола; ФЛ — фосфолипид; СЖК — свободные жирные кислоты; А-I — апобелок А-I. На рисунке показана роль трех ферментов: ГОЛП, ЛХАТ и ЛПЛ в постулируемом цикле ЛПВП, в результате которого происходит перенос холестерола из различных тканей в печень. ЛПВП$_2$ и ЛПВП$_3$ — см. табл. 26.2. ГОЛП катализирует гидролиз фосфолипида на поверхности ЛПВП$_2$, высвобождая холестерол, который поступает в печень.

ровой ткани уменьшается, а активность фермента в молочной железе возрастает и за счет этого увеличивается потребление поставляемых липопротеинами длинноцепочечных жирных кислот, необходимых для биосинтеза молочного жира.

Образование «остатков» липопротеинов

Хиломикроны под действием липопротеинлипазы теряют около 90% триацилглицеролов, а также апобелок С, который возвращается на ЛПВП, при этом апобелок Е остается. Образующийся **остаток хиломикрона** имеет диаметр в два раза меньший, чем исходный хиломикрон; содержание в нем холестерола и его эфиров увеличивается (за счет убыли триацилглицеролов). Подобному превращению подвергаются ЛПОНП, в результате образуются остатки ЛПОНП, которые называют также липопротеинами средней плотности (ЛПСП).

Роль печени

Остатки хиломикронов поглощаются клетками печени, где происходит гидролиз эфиров холестерола и триацилглицеролов. Поглощение остатков осуществляется, по-видимому, с участием **специфических рецепторов апобелка Е** (рис. 26.4). Приблизительно 50% остатков ЛПОНП поступают в печень по этому пути, а остальные 50% превращаются в ЛПНП.

Эксперименты с ЛПОНП, меченными по апобелку В, показали, что ЛПОНП являются предшественниками ЛПСП, которые в свою очередь являются предшественниками ЛПНП. Как показали расчеты, каждый из этих липопротеинов содержит одну или две молекулы апобелка В-100, которые сохраняются в процессе превращений. Каждая частица ЛПНП образуется из одной частицы ЛПОНП (рис. 26.5). Роль печени в данном процессе выяснена не до конца. У крыс большая часть апобелка В из ЛПОНП обнаруживается в печени и только небольшая доля — в ЛПНП. Это, по-видимому, связано с тем, что ЛПОНП у крыс наряду с апобелком В-100 содержат также апобелок В-48. Если рецепторы апобелка Е на поверхности клеток печени более специфичны к апобелку В-48, чем к апобелку В-100, то можно объяснить, почему у крыс большая часть ЛПСП поглощается клетками печени и образование ЛПНП происходит в ограниченном размере.

МЕТАБОЛИЗМ ЛПНП

Большая часть ЛПНП образуется, по-видимому, из ЛПОНП, как описано выше, однако имеются данные о том, что некоторая часть ЛПНП синтезируется непосредственно в печени. Период полувыведения из кровотока апобелка В, входящего в состав ЛПНП, составляет приблизительно 2,5 суток.

Исследования, проведенные на культурах фибробластов, лимфоцитов и гладкомышечных клеток артерий человека, показали, что на поверхности этих клеток есть специфические участки связывания или рецепторы для ЛПНП (рецепторы В-100); **при семейной гиперхолестеролемии** они не функционируют. Деградация примерно 50% ЛПНП осуществляется во внепеченочных тканях, а остальных 50% — в печени. Существует прямая корреляция между вероятностью возникновения **коронарного атеросклероза** и концентрацией ЛПНП в сыворотке крови.

МЕТАБОЛИЗМ ЛПВП (рис. 26.6)

Печень и кишечник синтезируют и секретируют ЛПВП. Однако в состав «новообразовавшихся» ЛПВП кишечника входит только апобелок А, а апобелок С в них отсутствует. Последний синтезируется в печени и переносится на ЛПВП из кишечника после того, как они поступают в кровь. ЛПВП являются своего рода хранилищем апобелков С и Е, которые необходимы для метаболизма хиломикронов и ЛПОНП.

Новообразовавшийся ЛПВП состоит из фосфолипидного бислоя, имеющего форму диска; он включает свободный холестерол и апобелок. Эти липопротеины похожи на частицы, обнаруженные в плазме крови пациентов с недостатком фермента плазмы **лецитин: холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ)**, а также в плазме крови больных с обтурационной желтухой. ЛХАТ, а возможно, и активатор ЛХАТ — апобелок A-I, связываются с ЛПВП. ЛХАТ катализирует реакцию между расположенными на поверхности фосфолипидом и свободным холестеролом с образованием эфира холестерола и лизолецитина. Неполярные эфиры холестерола перемещаются во внутреннюю гидрофобную часть бислоя, а лизолецитин переносится на сывороточный альбумин. При дальнейшем протекании реакции образуется неполярное ядро, которое раздвигает бислой, в результате образуется сферический псевдомицеллярный ЛПВП, покрытый снаружи слоем, состоящим из полярных липидов и апобелков. Эстерифицированный холестерол может переноситься с ЛПВП на липопротеины более низкой плотности, например хиломикроны, ЛПОНП и ЛПНП, **белком — переносчиком эфиров холестерола** (апобелком D), который является еще одним белковым компонентом ЛПВП. Белок D — переносчик эфиров холестерола обеспечивает транспорт эфиров холестерола от ЛПВП в клетки печени при участии либо остатков хиломикронов и ЛПОНП, либо ЛПНП. Далее система ЛХАТ обеспечивает удаление избытка неэстерифицированного холестерола из липопротеинов и из тканей. Печень, а возможно, и кишечник являются местом конечной деградации апобелков ЛПВП.

Для объяснения транспорта холестерола из тканей в клетки печени было выдвинуто предположение о цикле превращений ЛПВП (рис. 26.6). Рисунок позволяет понять, почему **концентрация ЛПВП$_2$ в плазме крови, с одной стороны, и концентрации хиломикронов и ЛПОНП изменяются реципрокно и в то же время концентрация ЛПВП$_2$ изменяется пропорционально активности липопротеинлипазы. Обратная зависимость между вероятностью возникновения коронарного атеросклероза** и концентрацией ЛПВП (ЛПВП$_2$) наблюдается, вероятно, потому, что последняя отражает эффективность удаления холестерола из тканей. ЛПВП$_c$ обнаружены в крови животных, у которых с помощью специальной диеты была вызвана гиперхолестеролемия. Этот липопротеин содержит большое количество холестерола, и единственным белком, входящим в его состав, является апобелок Е. ЛПВП$_c$ поглощается клетками печени при участии рецепторов апобелка Е, а также рецепторов ЛПНП. Последние поэтому иногда называют рецепторами апобелков В-100, Е. Атеросклеротические бляшки состоят из фагоцитов, поглотивших так много холестерола, что они превратились в заполненные эфирами холестерола губчатые клетки. Большинство таких клеток образуется из макрофагов, захватывающих аномальные, богатые холестеролом липопротеины, например химически модифицированный ЛПНП или β-ЛПОНП (см. с. 284). В работе Брауна и Гольдстайна (Brown, Goldstein, 1983) показано, что макрофаги секретируют как холестерол (который связывается подходящим акцептором, например ЛПВП), так и апобелок Е, который после соответствующего процессинга при участии ЛХАТ может явиться источником богатого холестеролом ЛПВП$_c$. Таким образом, ЛПВП$_c$ может играть важную роль в транспорте холестерола от различных тканей к клеткам печени («обратный транспорт холестерола»).

Изложенные выше сведения показывают, что все липопротеины плазмы взаимосвязаны и являются компонентами одного или нескольких метаболических циклов, функционирование которых обеспечивает сложный процесс транспорта липидов плазмы крови.

РОЛЬ ПЕЧЕНИ В ТРАНСПОРТЕ И МЕТАБОЛИЗМЕ ЛИПИДОВ

До недавнего времени считали, что метаболизм липидов происходит исключительно в печени. Когда же обнаружили, что большинство тканей способно полностью окислять жирные кислоты, и появились данные о том, что в жировой ткани происходит активный метаболизм липидов, взгляд на роль печени в обмене липидов изменился. Тем не менее концепция ключевой и уникальной роли печени в обмене липидов все еще является ведущей. Печень выполняет следующие важные функции в метаболизме липидов: 1) ускоряет переваривание и всасывание липидов, вырабатывая желчь, в состав которой входят холестерол и желчные кислоты, синтезируемые в печени; 2) содержит активные ферментные системы, катализирующие синтез и окисление жирных кислот, синтез триацилглицеролов, фосфолипидов и холестерола; 3) синтезирует липопротеины плазмы крови; 4) превращает жирные кислоты в кетоновые тела (кетогенез); 5) выполняет интегральную функцию в метаболизме липопротеинов плазмы крови. Некоторые из этих функций были описаны выше.

СИНТЕЗ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ И ОБРАЗОВАНИЕ ЛПОНП (рис. 26.7)

Сравнительные исследования, проведенные на гепатэктомированных и контрольных животных, показали, что печень является основным источником липопротеинов плазмы крови, образующихся из эндогенных источников. Триацилглицеролы, образующиеся в печени, являются непосредственными предшественниками триацилглицеролов, входящих в состав ЛПОНП. Жирные кислоты, необходимые для биосинтеза этих триацилглицеролов, либо синтезируются в печени из ацетил-СоА, образующегося главным образом из углеводов, либо поступают в виде свободных жирных кислот из кровотока. При хорошем питании преобладает первый путь, в этом случае процесс биосинтеза жирных кислот протекает активно, а уровень свободных жирных кислот в крови низок. Поскольку в норме при этих условиях триацилглицеролы не накапливаются в печени, можно сделать вывод о том, что сразу же после образования они транспортируются из печени в составе ЛПОНП. С другой стороны, при голодании, при приеме пищи, богатой жирами, или при сахарном диабете уровень свободных жирных кислот в крови повышается и большее количество этих кислот поглощается печенью. В этих условиях липогенез ингибируется, и свободные жирные кислоты являются основным источником жирных кислот, входящих в состав триацилглицеролов печени и ЛПОНП. Реакции биосинтеза триацилглицеролов и фосфолипидов описаны выше (см. гл. 25). Образование триацилглицеролов и секреция ЛПОНП печенью увеличивается в следующих условиях: 1) при потреблении богатой углеводами пищи (в особенности пищи, содержащей большое количество сахарозы или фруктозы), 2) при высоком содержании свободных жирных кислот в крови, 3) при потреблении этанола и 4) при высоких концентрациях инсулина и низких концентрациях глюкагона.

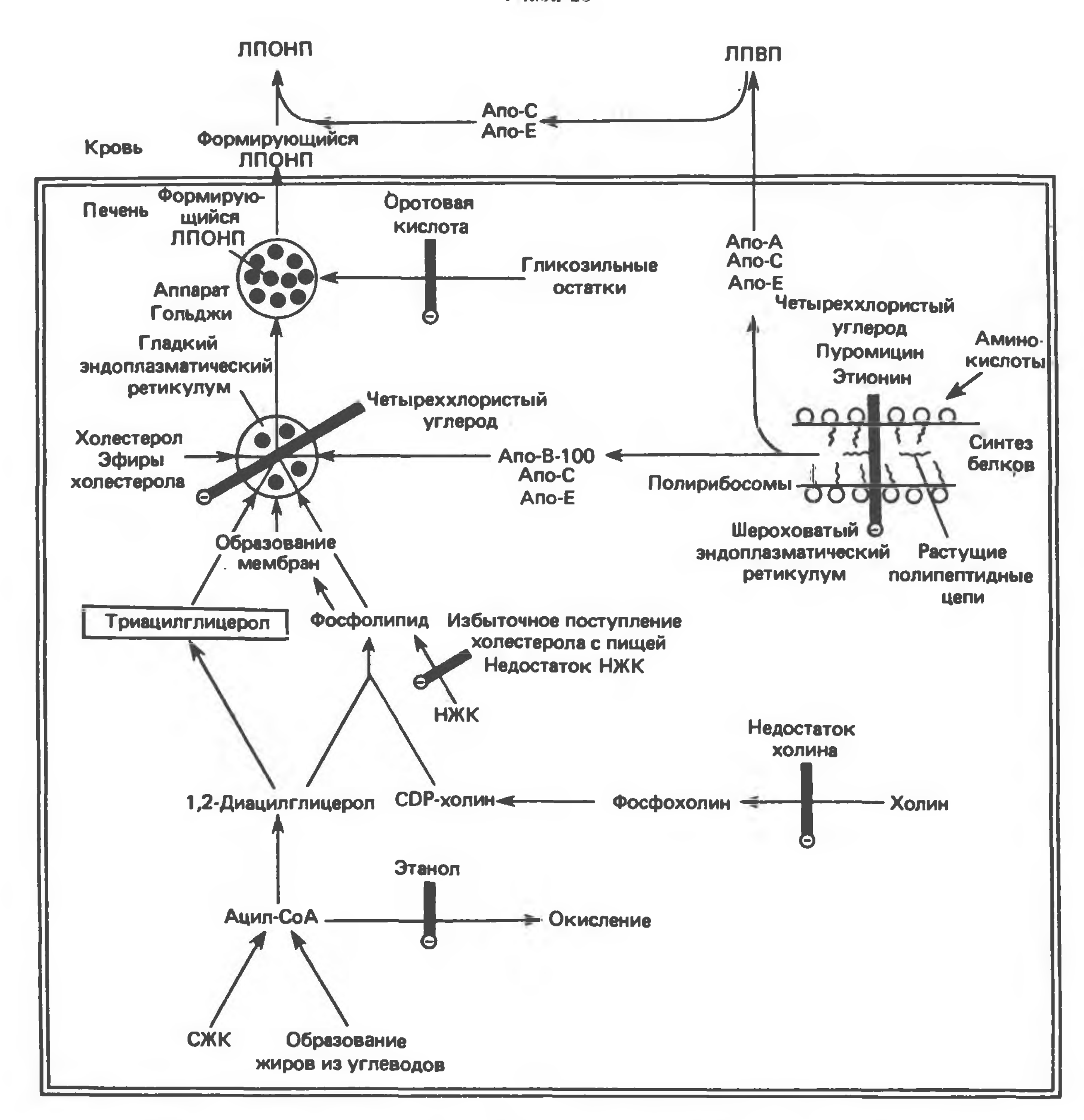


Рис. 26.7. Синтез липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и возможные места действия факторов, вызывающих накопление триацилглицеролов в печени и ее жировое перерождение. НЖК—незаменимые жирные кислоты; СЖК—свободные жирные кислоты; ЛПВП—липопротеины высокой плотности; Апо-А—апобелок А; Апо-В—апобелок В; Апо-С—апобелок С; Апо-Е—апобелок Е. Указанные пути лежат в основе процессов, схематично показанных на рис. 26.3, *Б*.

Жировое перерождение печени (рис. 26.7)

По различным причинам липиды, главным образом триацилглицеролы, могут накапливаться в печени. Избыточное накопление жира рассматривается как патологическое состояние. Когда накопление жира в печени становится хроническим, в клетках печени происходят фиброзные изменения, приводящие **к циррозу** печени и нарушению ее функций.

Наблюдаются два основных типа жирового перерождения печени. 1. Жировое перерождение первого типа возникает в результате **увеличения содержания свободных жирных кислот в плазме крови**, обусловленного либо мобилизацией жиров из жировой ткани, либо гидролизом триацилглицеролов, входящих в состав липопротеинов или хиломикронов внепеченочной липопротеинлипазой. Возрастает поглощение и эстерификация свободных жирных кислот клетками печени. Образующегося в печени количества липопротеинов оказывается недостаточно для утилизации поступающих жирных кислот, и последние накапливаются в печени в виде триацилглицеролов, вызывая ее жировое перерождение. Содержание

триацилглицеролов в печени значительно увеличивается при **голодании** и при **длительном потреблении пищи**, богатой жирами. Во многих случаях (например, при голодании) нарушается также способность печени секретировать ЛПОНП. При неконтролируемом **сахарном диабете, токсикозе беременности у овец и кетозе у крупного рогатого скота** жировая инфильтрация клеток печени может быть столь значительной, что печень увеличивается и имеет бледную окраску.

2. Жировое перерождение печени второго типа обычно обусловлено **метаболическим блоком образования липопротеинов плазмы крови**, в результате чего происходит накопление триацилглицеролов. Это нарушение может быть вызвано а) блокированием синтеза белковой части липопротеинов, б) блокированием образования липопротеинов из липидов и апобелков, в) недостаточным поступлением фосфолипидов, входящих в состав липопротеинов, г) нарушением собственно секреторного механизма.

Детально было изучено жировое перерождение печени у крыс, развивающееся при недостатке холина, который в связи с этим получил название **липотропного фактора**. Поскольку синтез холина происходит путем переноса подвижных метильных групп от метионина в процессе **трансметилирования** (см. гл. 31 и 32), причиной недостатка холина может стать нехватка подвижных метильных групп, переносимых от метионина. Предложено несколько механизмов, объясняющих действие холина в качестве липотропного фактора, в том числе снижение синтеза фосфолипидов, необходимых для образования липопротеинов.

Антибиотик пуромицин ингибирует синтез белков и вызывает жировое перерождение печени и значительное снижение концентрации ЛПОНП у крыс. Подобным же образом действуют и такие вещества, как этионин (α-амино-β-меркаптомасляная кислота), четыреххлористый углерод, хлороформ, фосфор, свинец и мышьяк. Холин не способен защитить организм от действия этих веществ, но, по-видимому, способствует выздоровлению. Весьма вероятно, что четыреххлористый углерод вызывает либо нарушение собственно механизма секреции липопротеинов, либо процесса взаимодействия липидов с апобелками при образовании липопротеинов. Действие четыреххлористого углерода является непосредственным, оно связано с трансформацией его молекулы. При этом, по-видимому, образуются свободные радикалы, которые вызывают образование пероксидов липидов, разрушающих липидные мембраны эндоплазматического ретикулума. Некоторый защитный эффект при индуцированных четыреххлористым углеродом процессах пероксидации оказывает введение в рацион витамина Е. Действие этионина обусловлено, как полагают, уменьшением доступности АТР. Так, при замене метионина в S-аденозилметионине этионином часть аденина оказывается связанной, что ограничивает синтез АТР. Оротовая кислота также вызывает жировое перерождение печени. Поскольку при этом в аппарате Гольджи накапливаются ЛПОНП, считают, что оротовая кислота нарушает процесс гликозилирования липопротеинов и таким образом ингибирует их высвобождение; это приводит к значительному уменьшению в плазме крови количества липопротеинов, содержащих апобелок В.

При недостатке витамина Е возрастает число некротических участков в печени при ее жировом перерождении, вызванном недостатком холина. Защитное действие при этом оказывает прием витамина Е или селен-содержащих соединений. Жировое перерождение печени может возникать при недостатке белков, а также незаменимых жирных кислот и витаминов (например, пиридоксина и пантотеновой кислоты). При недостатке незаменимых жирных кислот тормозится синтез фосфолипидов; поэтому жировое перерождение печени могут вызывать такие вещества, как холестерол, конкурирующие за доступные свободные жирные кислоты, участвующие в их эстерификации.

Путь превращения этанола

При **алкоголизме** также происходит накопление жира в печени, развивается гиперлипидемия, приводящая в конечном счете к циррозу печени. Точный механизм действия алкоголя при длительном его употреблении до конца не выяснен. Играет ли какую-либо роль в накоплении жира дополнительная мобилизация свободных жирных кислот, пока не ясно, но, как показано в ряде исследований, у крыс после введения одной токсичной дозы алкоголя происходит повышение уровня свободных жирных кислот. Однако при длительном употреблении алкоголя в печени накапливаются свободные жирные кислоты, поступившие не из жировой ткани, а образовавшиеся в результате эндогенного биосинтеза. После потребления алкоголя не наблюдается нарушения синтеза белков в печени. Имеются убедительные данные о том, что усиливается синтез триацилглицеролов в печени, уменьшается окисление жирных кислот и снижается активность цикла лимонной кислоты. Полагают, что это обусловлено окислением этанола в цитозоле клеток печени при участии алкогольдегидрогеназы и образованием избыточного количества NADH.

$$\underset{\text{ЭТАНОЛ}}{CH_3-CH_2-OH} + NAD^+ \xrightarrow{\text{АЛКОГОЛЬ-ДЕГИДРОГЕНАЗА}} \underset{\text{АЦЕТАЛЬДЕГИД}}{CH_3-CHO} + NADH + H^+$$

Образовавшийся NADH конкурирует за дыхательную цепь с восстанавливающими эквивалентами других соединений, ингибируя их окисление. При увеличении соотношения [NADH]/[NAD^+] происходит сдвиг влево в равновесии малат ⇄ оксалоацетат; это может снизить активность цикла лимонной кислоты. Суммарным результатом ингибирования окисления жирных кислот является усиление эстерификации жирных кислот с образованием триацилглицеролов, что, по-видимому, и является причиной жирового перерождения печени. При окислении этанола образуется ацетальдегид, который затем окисляется в митохондриях при участии альдегиддегидрогеназы (конечным продуктом является ацетат). Другие аспекты действия алкоголя — усиление липогенеза и синтез холестерола из ацетил-СоА. Увеличение соотношения [NADH]/[NAD^+] приводит также к увеличению соотношения [лактат]/[пируват], в результате чего развивается гиперлактатемия, которая в свою очередь снижает способность почек экскретировать мочевую кислоту. Возможно, именно это обстоятельство является причиной обострения подагры при употреблении алкоголя. Хотя основным путем метаболизма этанола является его окисление, катализируемое алкогольдегидрогеназой, часть этанола атакуется цитохром Р-450-зависимой микросомальной системой, функционирующей при участии NADPH и O_2. При хроническом алкоголизме эта система становится более активной, чем, вероятно, и объясняется ускорение метаболических превращений этанола, о чем говорит повышение содержания в крови как ацетальдегида, так и ацетата.

$$\underset{\text{Этанол}}{CH_2-CH_2-OH} + NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow \underset{\text{Ацетальдегид}}{CH_3-CHO} + NADP^+ + 2H_2O$$

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ И МОБИЛИЗАЦИЯ ЖИРОВ

Триацилглицеролы, находящиеся в жировой ткани, постоянно подвергаются липолизу (гидролизу) и вновь эстерифицируются (рис. 26.8). Эти превращения не являются прямой и обратной реакциями одного процесса. Они протекают по разным путям с участием различных реактантов и ферментов. Многие метаболические, гормональные и связанные с питанием **факторы, регулирующие процессы метаболизма в жировой ткани, оказывают действие либо на процессы эстерификации, либо на процессы липолиза**. Суммарный результат этих двух процессов определяет величину пула свободных жирных кислот в жировой ткани, последний служит источником свободных жирных кислот в плазме и определяет их уровень. Поскольку от уровня свободных жирных кислот в плазме в значительной степени зависит метаболизм в других тканях, в первую очередь в печени и мышцах, факторы, действующие в жировой ткани и регулирующие выход из нее свободных жирных кислот, оказывают влияние на процессы, происходящие далеко за пределами этой ткани.

ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА (рис. 26.8)

Эстерификация и липолиз

Триацилглицеролы синтезируются в жировой ткани из ацетил-СоА и глицерол-3-фосфата по механизму, приведенному на рис. 25.1. Из-за низкой активности в жировой ткани фермента **глицеролкиназы** глицерол практически не вовлекается в процесс эстерификации. **Необходимый для синтеза триацилглицеролов глицерол-3-фосфат образуется из глюкозы, поступающей в жировую ткань с кровью**.

Триацилглицеролы гидролизуются **гормончувствительной липазой** до свободных жирных кислот и глицерола. Этот фермент отличается от липопротеинлипазы, катализирующей гидролиз липопротеиновых триацилглицеролов перед их поглощением внепеченочными тканями (см. с. 262). Поскольку жировая ткань практически не способна утилизировать глицерол, он диффундирует в плазму крови, откуда поступает в такие ткани, как печень или почки, в которых подвергается дальнейшим превращениям благодаря наличию активной глицеролкиназы. Свободные жирные кислоты, образовавшиеся в процессе липолиза, превращаются в жировой ткани в ацил-СоА под действием ацил-СоА-синтетазы, а затем вновь эстерифицируются глицерол-3-фосфатом с образованием триацилглицеролов. Таким образом, в жировой ткани осуществляется непрерывный цикл, включающий липолиз и эстерификацию. Однако если скорость липолиза превышает скорость эстерификации, в жировой ткани накапливаются свободные жирные кислоты, которые затем диффундируют в плазму, где связываются сывороточным альбумином; в результате уровень свободных жирных кислот в плазме увеличивается. Свободные жирные кислоты плазмы служат одним из основных источников энергии для многих тканей.

Метаболизм глюкозы

При увеличении потребления глюкозы жировой тканью отток свободных жирных кислот из нее уменьшается, однако выход глицерола продолжается. Это свидетельствует о том, что действие глюкозы не вызывает уменьшения скорости липолиза. По-

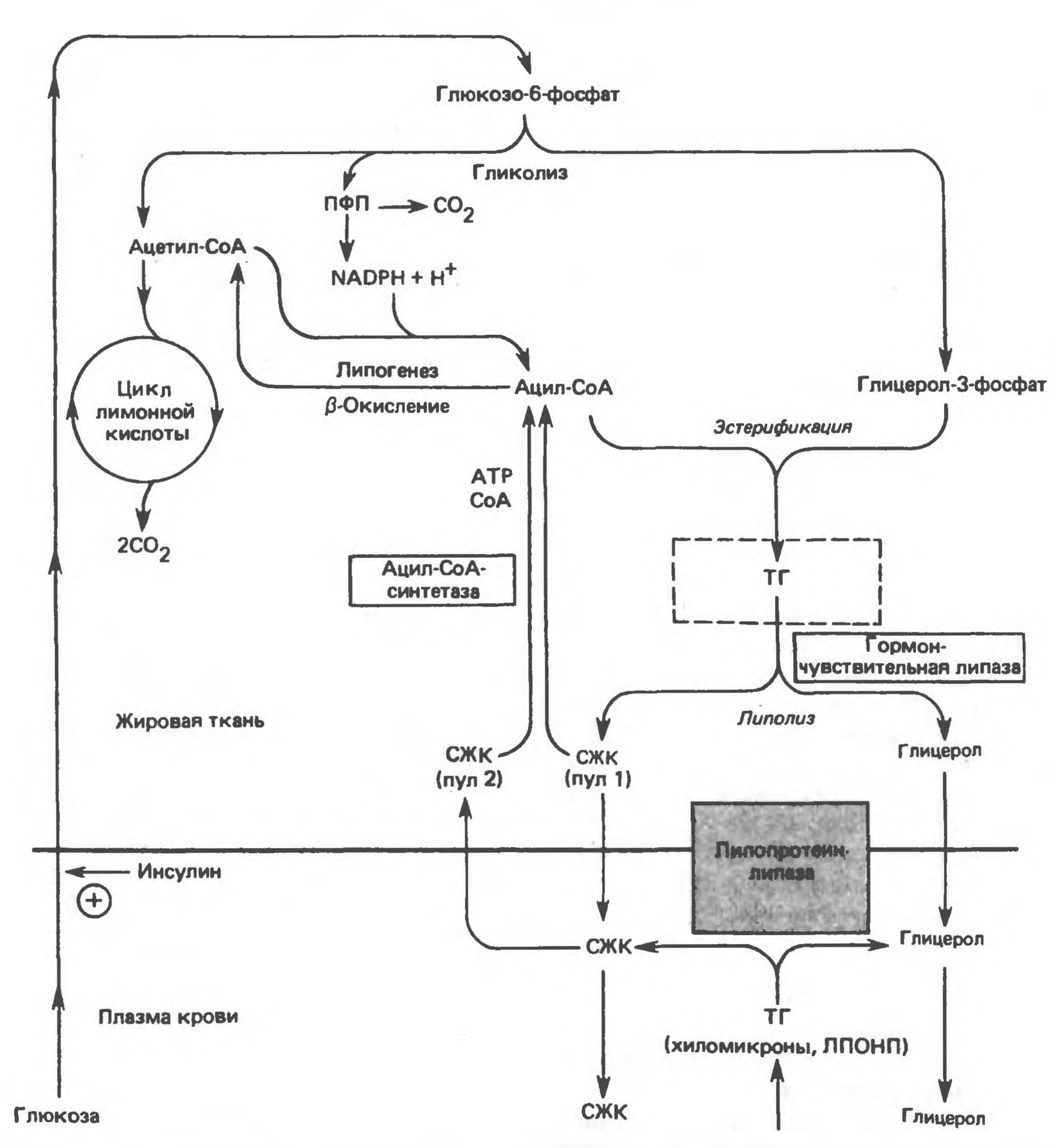


Рис. 26.8. Метаболические процессы в жировой ткани. Гормон-чувствительная липаза активируется АКТГ, ТТГ, глюкагоном, адреналином, норадреналином и вазопрессином и ингибируется инсулином, простагландином E_1 и никотиновой кислотой. Детали образования глицерол-3-фосфата из промежуточных продуктов гликолиза приведены на рис. 25.1. ПФП — пентозофосфатный путь; ТГ — триацилглицерол; СЖК — свободные жирные кислоты; ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности.

лагают, что глюкоза обеспечивает образование глицерол-3-фосфата, который эстерифицируется CoA-производными жирных кислот.

В жировой ткани осуществляется несколько путей метаболизма глюкозы, в том числе окисление в цикле лимонной кислоты до CO_2, окисление по пентозофосфатному пути, превращение в длинноцепочечные жирные кислоты и участие в образовании ацилглицеролов (в форме глицерол-3-фосфата). При поступлении глюкозы в жировую ткань в большом количестве основная ее часть окисляется до CO_2, а также превращается в жирные кислоты. Однако при уменьшении количества потребляемой глюкозы большая ее часть используется для образования глицерол-3-фосфата и затем ацилглицеролов, что позволяет свести до минимума отток свободных жирных кислот.

Поглощение свободных жирных кислот

В жировой ткани имеются по крайней мере два пула свободных жирных кислот. Пул свободных жирных кислот (рис. 26.8, пул 1), образующихся при гидролизе триацилглицеролов, идентичен пулу свободных жирных кислот, подвергающихся реэстерификации. Жирные кислоты данного пула поступают

также в плазму. Жирные кислоты, которые поглощаются из окружающей среды, после действия липопротеинлипазы на триацилглицеролы хиломикронов и ЛПОНП образуют другой пул (пул 2); меченые жирные кислоты пула 2 могут попасть в пул 1 только после вхождения в состав триацилглицеролов.

РОЛЬ ГОРМОНОВ В МОБИЛИЗАЦИИ ЖИРОВ

Инсулин

Скорость высвобождения свободных жирных кислот из жировой ткани регулируется рядом гормонов, влияющих либо на скорость липолиза, либо на скорость эстерификации. Инсулин ингибирует выход свободных жирных кислот из жировой ткани, в результате чего уменьшается концентрация свободных жирных кислот в плазме. Он усиливает процесс липогенеза и биосинтез ацилглицеролов, окисление глюкозы до CO_2 по пентозофосфатному пути. Все эти эффекты зависят от концентрации глюкозы и могут быть объяснены в значительной мере способностью инсулина увеличивать поступление глюкозы в клетки жировой ткани; это достигается в результате транслокации переносчиков глюкозы из аппарата Гольджи к плазматической мембране. Показано, что инсулин увеличивает также активность **пируватдегидрогеназы, ацетил-СоА-карбоксилазы** и **глицеролфосфат-ацилтрансферазы;** на фоне увеличения поступления глюкозы в клетки жировой ткани эти ферменты способствуют усилению синтеза жирных кислот и ацилглицеролов. Известно, что эти ферменты координированно регулируются путем ковалентной модификации, а именно по механизму фосфорилирования — дефосфорилирования.

Основное действие инсулина в жировой ткани состоит в ингибировании активности **гормон-чувствительной липазы,** в результате чего уменьшается высвобождение не только свободных жирных кислот, но и глицерола. Жировая ткань более чувствительна к действию инсулина, чем многие другие ткани. **Это свидетельствует о том, что in vivo жировая ткань является главным местом действия инсулина.**

Гормоны, стимулирующие липолиз (рис. 26.9)

Ряд других гормонов ускоряет высвобождение свободных жирных кислот из жировой ткани и повышает их концентрацию в плазме путем увеличения скорости липолиза триацилглицеролов. К таким гормонам относятся адреналин, норадреналин, глюкагон, адренокортикотропный гормон (АКТГ), α- и β-меланоцитстимулирующий гормон (МСГ), тиреотропный гормон (ТТГ), гормон роста (ГР) и вазопрессин. Многие из этих гормонов являются активаторами гормон-чувствительной липазы. Для оптимального протекания большинства липолитических процессов необходимо присутствие **глюкокортикоидов и гормонов щитовидной железы.** Сами по себе эти гормоны не оказывают прямого влияния на липолиз, а действуют как факторы, **стимулирующие** действие других гормонов.

Гормоны, которые быстро промотируют липолиз, например катехоламины, стимулируют активность **аденилатциклазы** — фермента, катализирующего превращение АТР в сАМР. Механизм действия в этом случае аналогичен механизму гормональной стимуляции гликогенолиза, рассмотренному выше (см. гл. 19). сАМР путем стимуляции сАМР-зависимой протеинкиназы превращает неактивную гормон-чувствительную триацилглицероллипазу в активную липазу. Липолиз регулируется в основном количеством сАМР, присутствующим в тканях. Следовательно, процессы, вызывающие разрушение сАМР или приводящие к его образованию, оказывают также действие на липолиз. сАМР гидролизуется до 5′-АМР при участии **цикло-3′, 5′-нуклеотидфосфодиэстеразы.** Этот фермент ингибируется метилксантинами, такими, как **кофеин и теофиллин.** Поэтому потребление кофе, содержащего кофеин, вызывает существенное и длительное повышение уровня СЖК в плазме крови человека.

Инсулин действует как антагонист гормонов, стимулирующих липолиз. В настоящее время полагают, что липолиз более чувствителен к изменению концентрации инсулина в крови, чем процессы утилизации глюкозы и реакции эстерификации. Антилиполитическое действие инсулина, никотиновой кислоты и простагландина E_1 можно объяснить либо ингибированием синтеза сАМР на стадии, катализируемой аденилатциклазой, либо стимулированием действия фосфодиэстеразы. В основе механизма действия гормонов щитовидной железы лежит, вероятно, увеличение уровня сАМР за счет создания более благоприятных условий для прохождения стимула от рецептора на наружной стороне клеточной мембраны к участку локализации аденилатциклазы на внутренней стороне мембраны, а также ингибирования активности фосфодиэстеразы. Стимулирующее действие гормона роста на липолиз развивается медленно. Оно связано с синтезом ферментов, участвующих в образовании сАМР. Глюкокортикоиды стимулируют липолиз, ускоряя синтез липазы сАМР-независимым путем, который ингибируется инсулином. Приведенные данные помогают понять роль гипофиза и коры надпочечников в усилении мобилизации жиров.

Симпатическая нервная система путем высвобождения норадреналина в жировой ткани играет центральную роль в мобилизации свободных жирных кислот. Усиление липолиза, вызываемое действием многих из рассмотренных выше факторов, можно

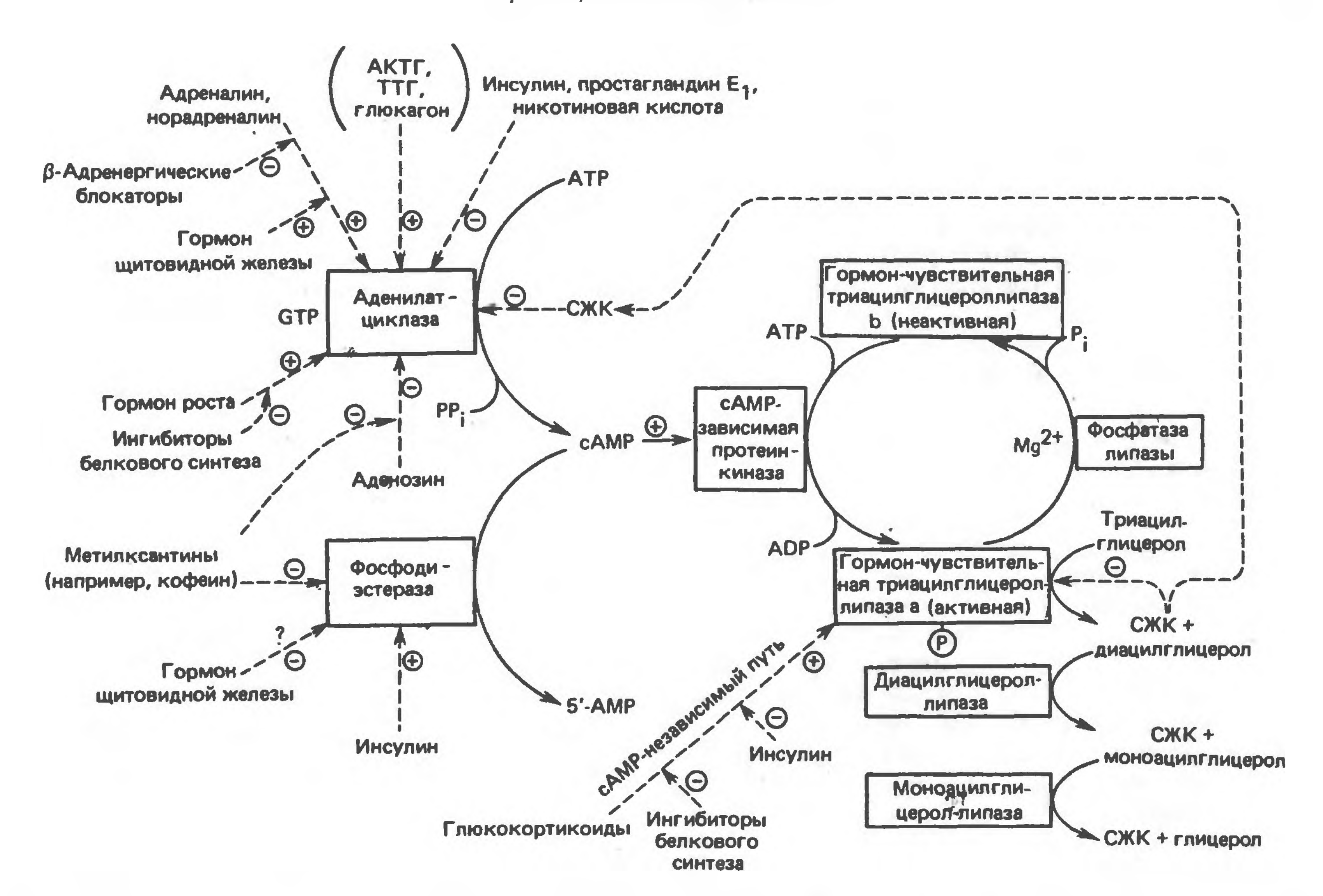


Рис. 26.9. Регуляция липолиза в жировой ткани. ТТГ — тиреотропный гормон; СЖК — свободные жирные кислоты. Обратите внимание на то, что благодаря каскадной последовательности ускорение процесса может происходить на различных стадиях. Липолиз тормозится при: 1) удалении стимулирующего гормона; 2) действии фосфатазы липазы; 3) ингибировании липазы и аденилатциклазы высокими концентрациями СЖК; 4) ингибировании аденилатциклазы аденозином; 5) гидролизе cAMP, катализируемом фосфодиэстеразой. Возможно, что АКТГ, ТТГ и глюкагон не активируют аденилатциклазу in vivo, поскольку необходимые in vitro концентрации каждого из этих гормонов гораздо выше, чем обнаруживаемые в кровотоке. Пунктирными линиями показаны положительные (+) и отрицательные (−) регуляторные эффекты, а сплошными линиями — поток субстратов.

уменьшить или полностью предотвратить путем денервации жировой ткани, блокадой нервных ганглиев гексаметонием или путем истощения резервов норадреналина при введении резерпина.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ

Жировая ткань человека не является, по-видимому, важным местом липогенеза. На это указывают опыты с мечеными глюкозой и пируватом, которые показали, что лишь очень незначительная часть метки обнаруживается в длинноцепочечных жирных кислотах. В жировой ткани, по-видимому, отсутствует ключевой фермент липогенеза — ATP-цитратлиаза; следует также отметить, что активность этого фермента в клетках печени очень низкая. Другие ферменты, например глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и «яблочный» фермент, активность которых адаптивно возрастает в ткани крыс при усилении липогенеза, не изменяют активности в жировой ткани человека. Предполагают, что для человека характерен «синдром избытка углеводов», обусловленный ограниченной способностью организма трансформировать избыток углеводов путем липогенеза. У птиц липогенез протекает в печени и приобретает особое значение в связи с необходимостью липидов для образования яиц. Жировая ткань человека не чувствительна к действию большинства гормонов, стимулирующих липолиз, кроме катехоламинов. Представляет интерес также отсутствие «липолитического» ответа на адреналин у кроликов, морских свинок, свиней и кур, выраженное липолитическое действие глюкагона у птиц наряду с отсутствием антилиполитического действия инсулина и наконец отсутствие синтеза ацилглицеролов

из глюкозы у голубей. По-видимому, все это свидетельствует о том, что у исследованных видов животных функционируют различные механизмы регуляции метаболических процессов в жировой ткани.

Учитывая, с одной стороны, что у больных сахарным диабетом возникают глубокие нарушения метаболизма, главным образом в результате избыточного поступления свободных жирных кислот из жировых депо, и что, с другой стороны, инсулин в значительной мере устраняет эти нарушения, можно сделать вывод о том, что этот гормон **играет важную роль в регуляции метаболизма в жировой ткани.**

РОЛЬ БУРОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ТЕРМОГЕНЕЗЕ

Бурая жировая ткань становится зоной активного метаболизма в первую очередь в тех случаях, когда организму необходимо генерировать тепло. Эта ткань характеризуется высоким уровнем метаболизма при пробуждении от зимней спячки (у некоторых видов животных), при охлаждении (термогенез без озноба), а также у новорожденных животных. У человека эта ткань играет менее важную роль, но, как показали исследования, у здоровых людей бурая жировая ткань достаточно активна и, по-видимому, осуществляет термогенез, индуцированный приемом пищи; это позволяет объяснить, почему некоторые люди не полнеют, хотя потребляют много пищи. Следует отметить, что у людей, страдающих ожирением, бурая жировая ткань либо выражена очень незначительно, либо вообще отсутствует. Бурая жировая ткань хорошо снабжается кровью, в ее клетках сравнительно высокое содержание митохондрий и цитохромов, а активность ATP-синтазы весьма незначительна. Бурая жировая ткань эффективно окисляет как глюкозу, так и жирные кислоты.

Норадреналин, высвобождаемый из окончаний симпатических нервных волокон, стимулирует липолиз в бурой жировой ткани. В митохондриях клеток этой ткани окисление и фосфорилирование не являются сопряженными процессами, на что указывает отсутствие эффекта действия динитрофенола, а также дыхательного контроля со стороны ADP. В клетках бурой жировой ткани фосфорилирование протекает на субстратном уровне, например на стадии, катализируемой сукцинат-тиокиназой, и при гликолизе. Таким образом, **при окислении образуется много тепла и лишь незначительная часть свободной энергии запасается в виде ATP.** С позиций хемиосмотической теории следует, что протонный градиент, существующий в норме на внутренней мембране митохондрий, в бурой ткани рассеивается; эту функцию выполняет **термогенин** — белок, который осуществляет перенос протонов через мембрану. Эти представления позволяют объяснить кажущееся отсутствие влияния разобщителей (рис. 26.10).

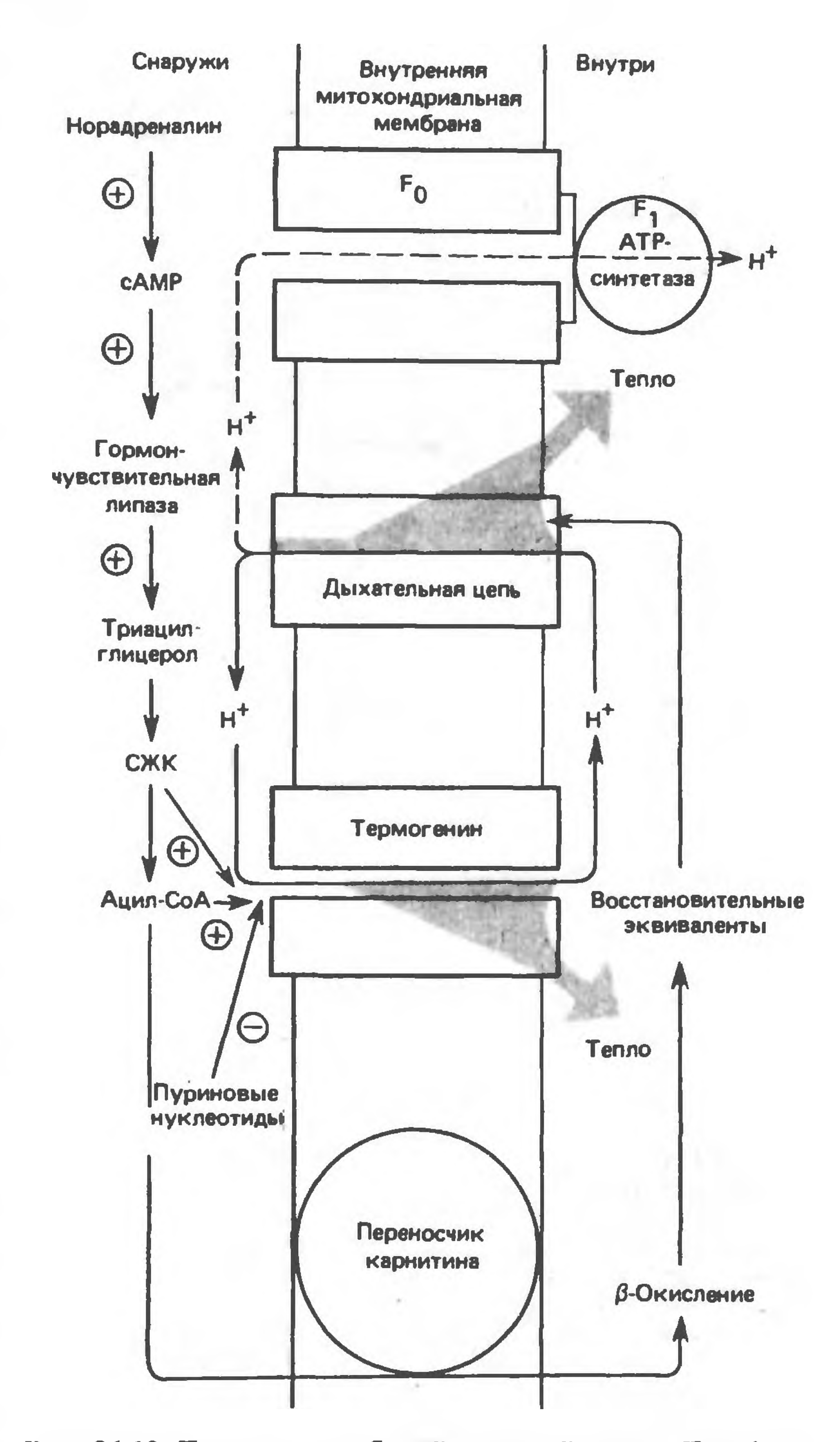


Рис. 26.10. Термогенез в бурой жировой ткани. При функционировании дыхательной цепи наряду с переносом протонов генерируется теплота. При возвращении протонов во внутренний митохондриальный компартмент по каналу, образуемому термогенином, ATP не синтезируется (как это имеет место при переносе протонов системой F_1-ATP-синтазы), а происходит рассеивание энергии в форме теплоты. В условиях, когда бурая жировая ткань не стимулируется, перенос H^+ по термогениновому каналу ингибируется пуриновыми нуклеотидами. Это ингибирование снимается норадреналином, который стимулирует образование свободных жирных кислот (СЖК) и ацил-CoA. Обратите внимание на двойную роль ацил-CoA, который не только усиливает действие термогенина, но и поставляет восстановительные эквиваленты для дыхательной цепи. (⊕) положительные и (⊖) отрицательные регуляторные эффекты.

ЛИТЕРАТУРА

Brown M. S., Goldstein J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, Annu. Rev. Biochem., 1983, **52**, 223.

Cryer A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism, Int. J. Biochem., 1981, **13**, 525.

Eisenberg S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism, Klin. Wochenschr., 1983, **61**, 119.

Fain J. N. Hormonal regulation of lipid mobilization from adipose tissue. Page 119 in: Biochemical Actions of Hormones. Vol. 7. Litwack G. (ed.), Academic Press, 1980.

Fielding C. J., Fielding P. E. Metabolism of cholesterol and lipoproteins. Page 404 in: Biochemistry of Lipids and Membranes; Vance D. E., Vance J. E. (ed.), Benjamin/Cummings, 1985.

Himms-Hagen J. Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis, Annu. Rev. Nutr., 1985, **5**, 69.

Krauss R. M. Regulation of high density lipoprotein level, Med. Clin. North Am., 1982, **66**, 403.

Lieber C. S. Alcohol and the liver: Metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury, Acta. Med. Scand. (Suppl), 1985, **703**, 11.

Sparks J. D., Sparks C. E. Apolipoprotein B and lipoprotein metabolism, Adv. Lipid Res., 1985, **21**, 1.

Глава 27

Синтез, транспорт и экскреция холестерола

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Холестерол содержится в составе липопротеинов либо в свободной форме, либо в виде эфиров с длинноцепочечными жирными кислотами. Он синтезируется во многих тканях из ацетил-CoA и выводится из организма с желчью в виде свободного холестерола или солей желчных кислот. Холестерол является предшественником других стероидов, а именно кортикостероидов, половых гормонов, желчных кислот и витамина D. Он является соединением, типичным для метаболизма животных, и содержится в значительных количествах в продуктах животного происхождения: яичном желтке, мясе, печени и мозге.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Холестерол представляет собой амфипатический липид и является незаменимым структурным компонентом мембран и наружного слоя липопротеинов плазмы крови. Липопротеины транспортируют холестерол в кровотоке, где легко устанавливается равновесие с холестеролом, входящим в состав других липопротеинов и мембран. Холестерол находится во многих тканях в эстерифицированной форме. Он транспортируется в организме в составе липопротеинов, посредниками при поглощении холестерола и его эфиров различными тканями являются ЛПНП. Свободный холестерол удаляется из тканей при участии ЛПВП и транспортируется в печень, где превращается в желчные кислоты. Он является основным компонентом желчных камней, однако его главная роль в патологии состоит в том, что он служит фактором, вызывающим атеросклероз жизненно важных артерий головного мозга, сердечной мышцы и других органов. При коронарном атеросклерозе наблюдается высокая величина соотношения холестерол ЛПНП/холестерол ЛПВП в плазме.

БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРОЛА

Приблизительно половина холестерола, имеющегося в организме, образуется путем биосинтеза (около 500 мг $сут^{-1}$), а другая половина поступает с пищей. Холестерол синтезируется главным образом в печени (~50% от общего количества образующегося холестерола), кишечнике (~15%) и коже (большая часть остальной доли).

ПУТЬ БИОСИНТЕЗА

Все клетки, не утратившие ядро, способны синтезировать холестерол. Биосинтез холестерола происходит в микросомах (эндоплазматическом ретикулуме) и цитозоле.

Источником всех атомов углерода, входящих в молекулу холестерола, является **ацетил-CoA.** Путь биосинтеза сложной молекулы холестерола исследован во многих работах, и в настоящее время получены результаты, на основании которых установлено происхождение всех фрагментов молекулы холестерола (рис. 27.1, 27.2 и 27.3). Синтез этого вещества происходит в несколько стадий. 1. Мевалонат, в состав молекулы которого входит 6 атомов углерода, синтезируется из ацетил-CoA (рис. 27.1). 2. При отщеплении от мевалоната CO_2 образуется изопреноидная единица (рис. 27.2). 3. Шесть изопреноидных единиц конденсируются с образованием промежуточного соединения сквалена. 4. Сквален циклизуется, образуя исходный стероид ланостерол. 5. Путем дальнейших превращений, включающих удаление трех метильных групп, ланостерол превращается в холестерол. (рис. 27.3).

1. Образование мевалоната через ГМГ-CoA (3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA) протекает в цитозоле в результате такой же последовательности реакций, как и для биосинтеза кетоновых тел в митохондриях (гл. 28).

На первом этапе синтеза холестерола две молекулы ацетил-CoA конденсируются под действием цитозольного фермента **тиолазы** с образованием ацетоацетил-CoA. В альтернативном случае ацетоацетат, образовавшийся в митохондриях печени по пути кетогенеза (см. гл. 28), диффундирует в цитозоль, где превращается в активное производное —

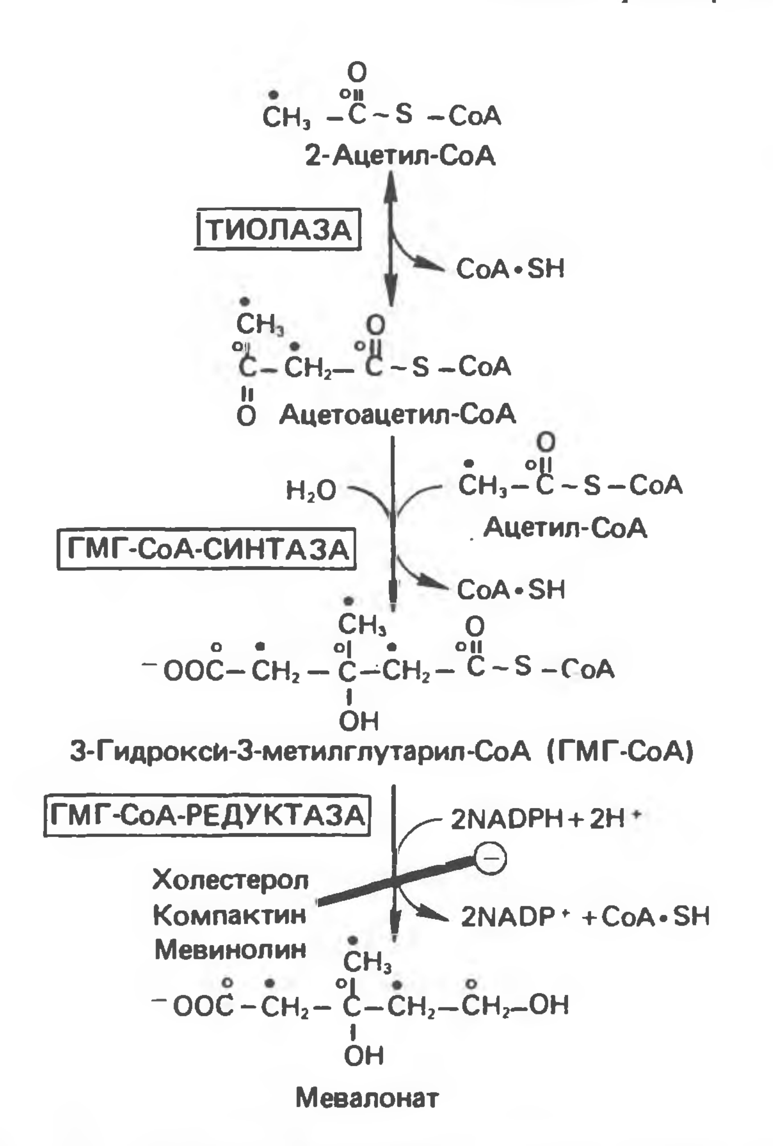


Рис. 27.1. Биосинтез мевалоната. ГМГ — 3-гидрокси-3-метилглутарат. ГМГ-CoA-редуктаза ингибируется холестеролом, а также метаболитами грибов компактином и мевинолином, которые конкурируют с ГМГ-CoA.

ацетоацетил-CoA (реакция катализируется **ацетоацетил-CoA-синтазой** при участии CoA и АТР). Другой фермент, **ГМГ-CoA-синтаза**, катализирует конденсацию ацетоацетил-CoA с ацетил-CoA с образованием ГМГ-CoA.

Затем ГМГ-CoA превращается в **мевалонат** путем двухступенчатого восстановления за счет NADPH, катализируемого микросомальным ферментом **ГМГ-CoA-редуктазой.** Предполагается, что эта реакция является скорость-лимитирующей стадией на пути синтеза холестерола (рис. 27.1).

2. Мевалонат фосфорилируется АТР с образованием ряда активных фосфорилированных интермедиатов (рис. 27.2). Образовавшийся 3-фосфо-5-пирофосфомевалонат декарбоксилируется, в результате образуется **изопентилпирофосфат** — активная изопреноидная единица.

3. На следующем этапе происходит конденсация трех молекул изопентенилпирофосфата с образованием **фарнезилпирофосфата.** Процесс начинается с изомеризации изопентилпирофосфата (путем перемещения двойной связи) в **диметилаллилпирофосфат.** Последний конденсируется с другой молекулой изопентенилпирофосфата с образованием десятиуглеродного интермедиата **геранилпирофосфата** (рис. 27.2), который затем конденсируется с еще одной молекулой изопентенилпирофосфата; в результате образуется фарнезилпирофосфат. Две молекулы фарнезилпирофосфата конденсируются концами, несущими пирофосфатные группы; сначала отщепляется одна пирофосфатная группа и образуется промежуточное соединение прескваленпирофосфат, которое затем восстанавливается NADPH с элиминированием оставшейся пирофосфатной группы и превращается в **сквален**. Следует отметить, что может функционировать побочный путь, который называют «*транс*-метилглутаконатный шунт». По этому пути значительная доля (20%) диметилаллилпирофосфата превращается в ГМГ-CoA (через *транс*-3-метилглутаконат-CoA). По-видимому, данный путь может участвовать в регуляции скорости синтеза холестерола.

4. Сквален имеет структуру, подобную стероидному ядру (рис. 27.3). Перед стадией циклизации сквален превращается в эндоплазматическом ретикулуме в 2,3-оксид сквалена под действием **скваленэпоксидазы**, которая относится к оксидазам со смешанной функцией. При циклизации, катализируемой **оксидосквален—ланостерол-циклазой,** метильная группа у C_{14} переносится на C_{13}, а метильная группа у C_8 — на C_{14}.

5. На последнем этапе (рис. 27.3) **ланостерол** превращается в мембранах эндоплазматического ретикулума в холестерол, при этом происходят изменения в стероидном ядре и боковой цепи. Метильная группа при C_{14} окисляется до CO_2, и образуется 14-десметилланстерол. Подобным же образом удаляются еще две метильные группы при C_4, и образуется зимостерол. Далее путем перемещения двойной связи между C_8 и C_9 в положение между C_8 и C_7 образуется $\Delta^{7,24}$-холестадиенол. В результате дальнейшего перемещения двойной связи в кольце В в положение между C_5 и C_6, характерное для молекулы холестерола, образуется **десмостерол**, и наконец, в результате восстановления двойной связи в боковой цепи образуется холестерол. Восстановление двойной связи в боковой цепи может, однако, происходить и на предшествующих стадиях биосинтеза холестерола. Следует отметить, что до настоящего времени еще нет точных данных о последовательности некоторых описанных выше превращений.

Предполагают, что промежуточные продукты на стадиях превращения сквалена в холестерол связываются специальным **сквален- и стеролпереносящим белком.** Этот белок связывает стеролы и другие нерастворимые липиды, обеспечивая им возможность участия в реакциях, протекающих в водной фазе клетки. Весьма вероятно, что холестерол превращается в стероидные гормоны и желчные кислоты, а так-

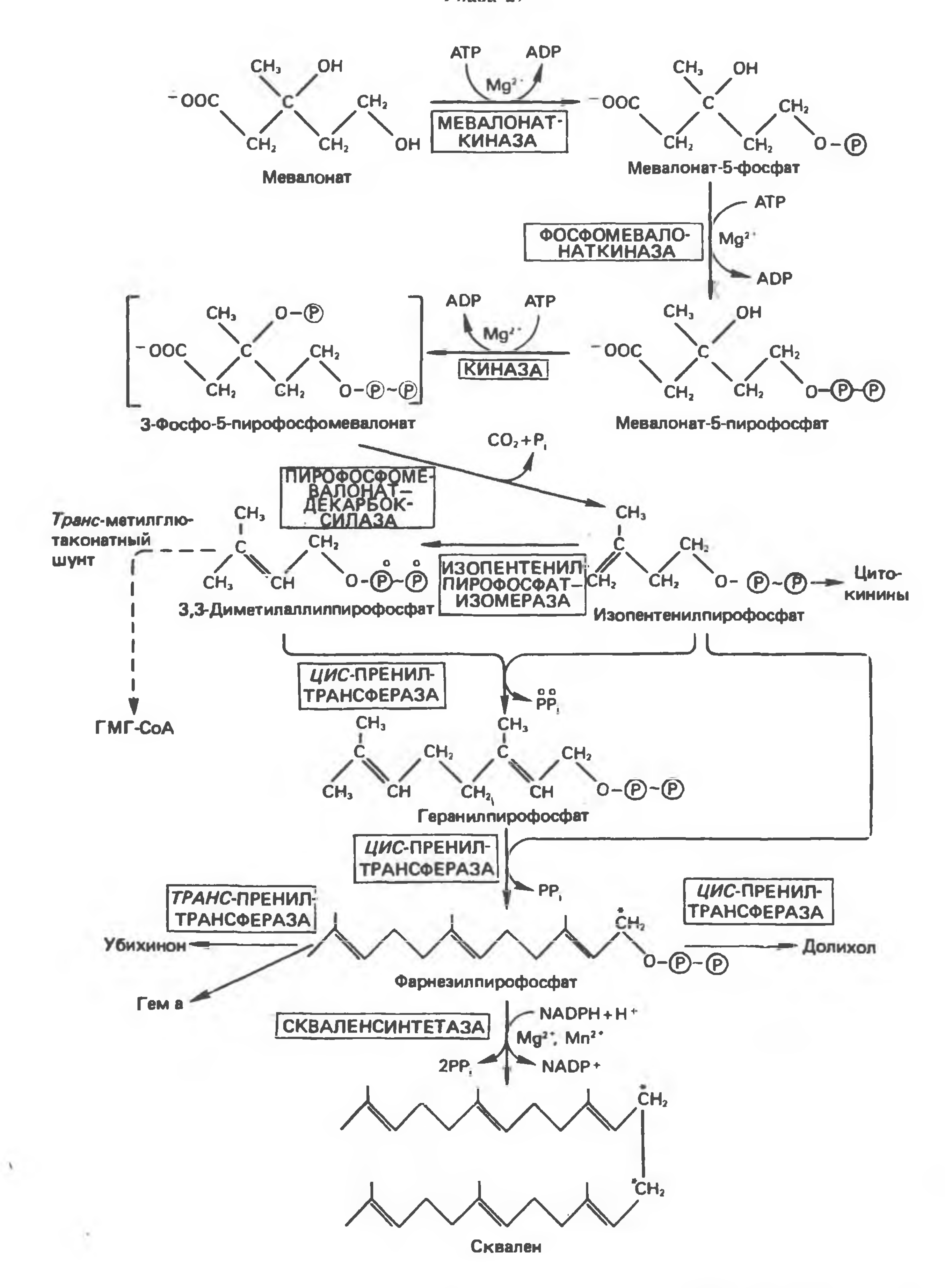


Рис. 27.2. Биосинтез сквалена, убихинона и долихола. ГМГ — 3-гидрокси-3-метилглутарат. Фарнезильный остаток входит в состав гема цитохромоксидазы. Атом углерода, помеченный звездочкой, занимает положение C_{11} или C_{12} в молекуле сквалена. Скваленсинтетаза является микросомальным ферментом, все остальные ферменты — растворимые белки цитоплазмы. Цитокинины представлены изопентениладенином — компонентом тРНК.

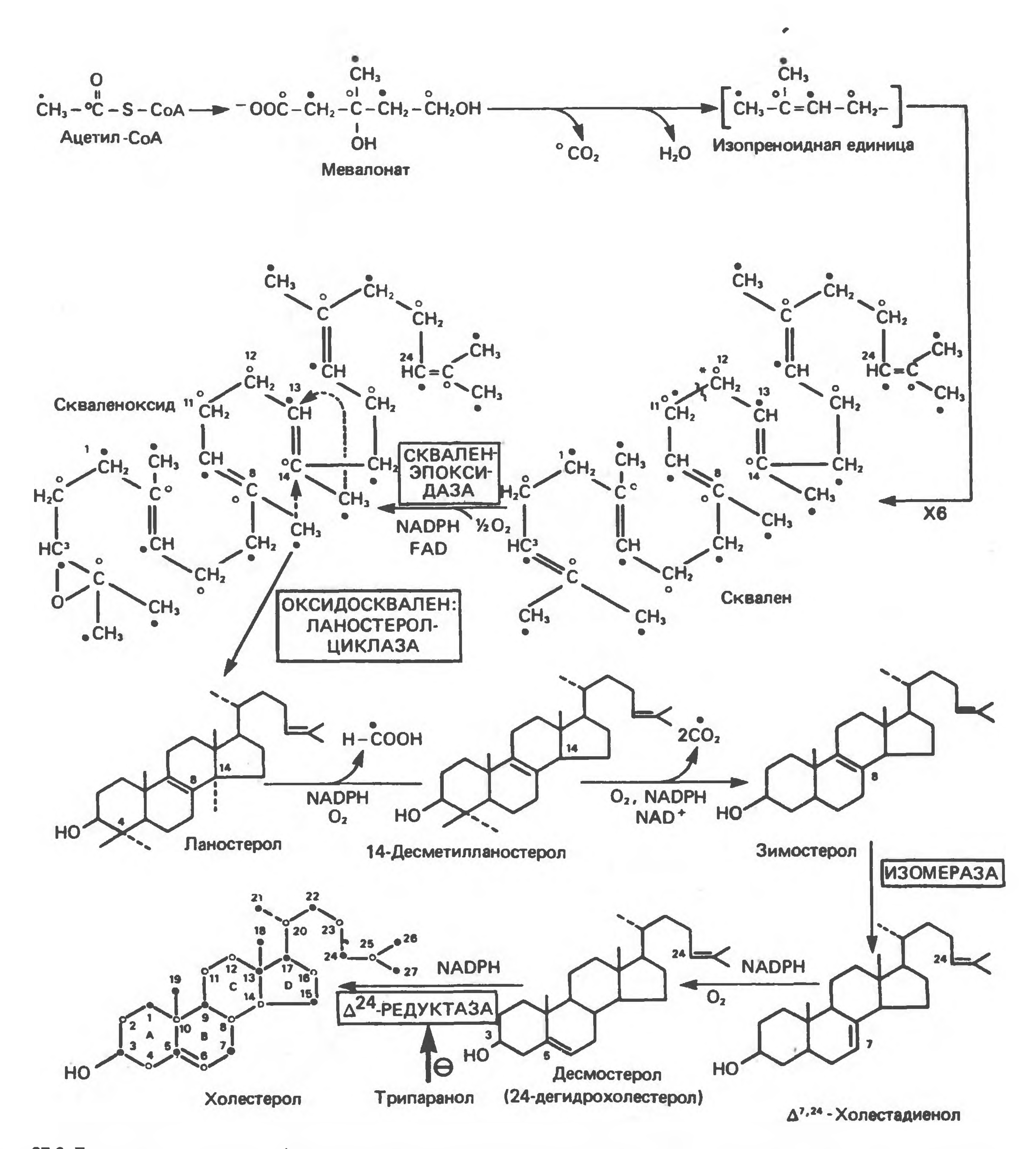


Рис. 27.3. Биосинтез холестерола. Атомы углерода пронумерованы, как в стероидном ядре. Звездочкой обозначены метки в сквалене, указанные на рис. 27.2.

же участвует в образовании мембран и липопротеинов, будучи связанным с холестеролпереносящим белком.

Синтез других изопреноидных соединений

Фарнезилпирофосфат является предшественником других полиизопреноидов — **долихола** и **убихинона**. Полиизопренильный спирт долихол образуется путем присоединения еще 16 остатков изопентенилпирофосфата, а боковая цепь убихинона формируется путем присоединения 3—7 изопреноидных единиц.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРОЛА

Регуляция синтеза холестерола происходит на раннем этапе пути. У голодающих крыс наблюдается выраженное снижение активности ГМГ-СоА-редуктазы, что объясняет **уменьшение синтеза холестерола в период голодания**. ГМГ-СоА-редуктаза ингибируется в печени холестеролом по принципу обратной связи. Поскольку прямого ингибирования фермента не наблюдается, по-видимому, холестерол (или его метаболит, например окисленный стерол) действует опосредованно: либо подавляя синтез редуктазы de novo, либо индуцируя синтез ферментов, катализирующих инактивацию редуктазы. Синтез холестерола ингибируется также холестеролсодержащими ЛПНП при их связывании с соответствующими рецепторами (рецепторы апо-В-100). Интенсивность синтеза холестерола и активность ГМГ-СоА-редуктазы меняются в зависимости от времени суток. Результаты ряда исследований свидетельствуют о весьма быстром действии холестерола на редуктазную активность, которое нельзя объяснить только влиянием на скорость синтеза фермента. При введении инсулина или тиреоидного гормона активность ГМГ-СоА-редуктазы увеличивается, а при введении глюкагона или глюкокортикоидов уменьшается. ГМГ-СоА-редуктаза может находиться либо в активном, либо в неактивном состоянии. Переход из одного состояния в другое происходит в результате реакций фосфорилирования и дефосфорилирования, некоторые из них, по-видимому, являются сАМР-зависимыми и поэтому регулируются глюкагоном (рис. 27.4). Влияние количества холестерола, поступающего с пищей, на образование эндогенного холестерола было изучено на крысах. Если пища содержала только 0,05% холестерола, то 70—80% холестерола, обнаруживаемого в печени, тонком кишечнике и надпочечниках, синтезировалось эндогенно, а если пища содержала 2% холестерола, эндогенный синтез холестерола уменьшался. Однако при увели-

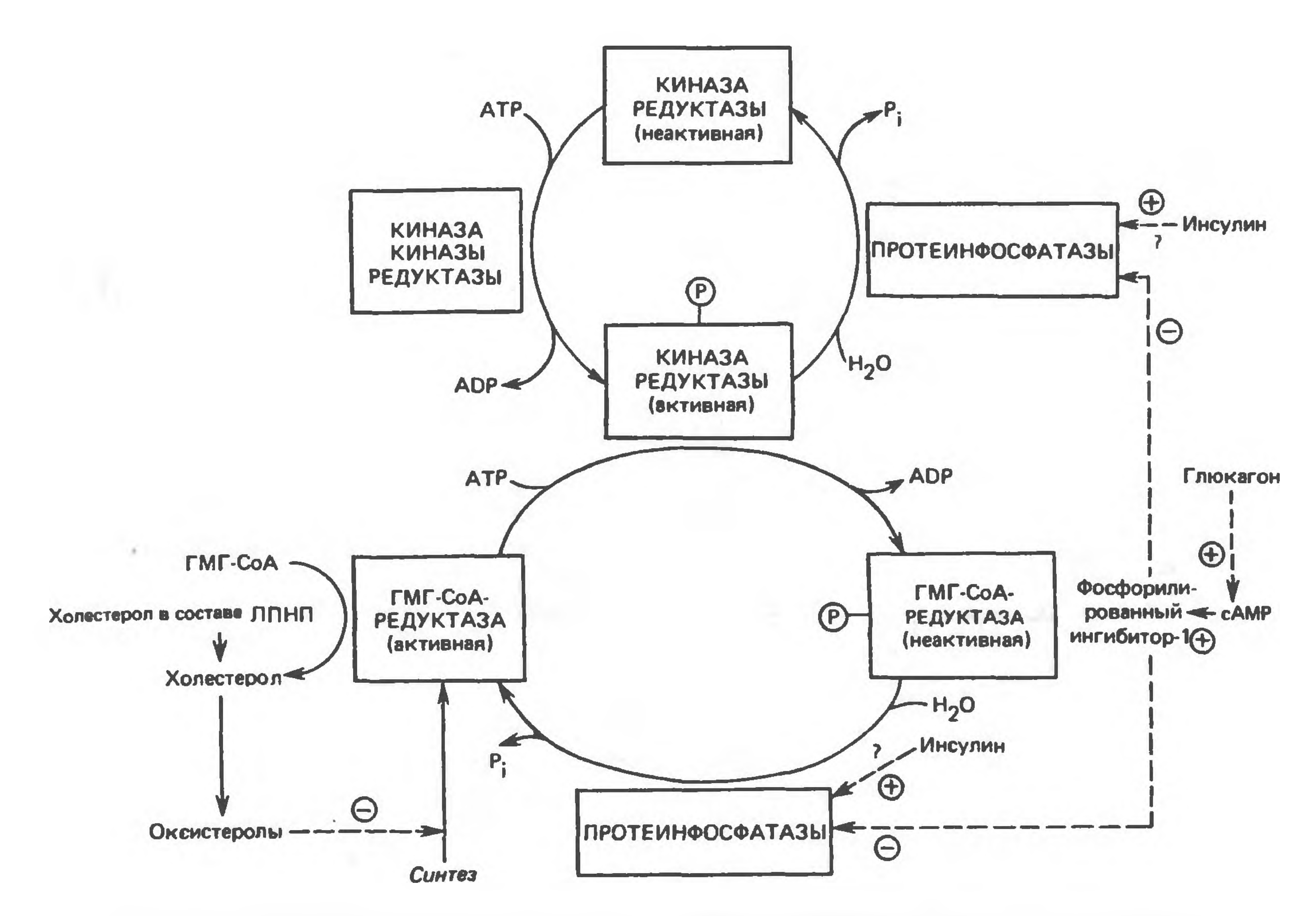


Рис. 27.4. Возможные механизмы регуляции синтеза холестерола ГМГ-СоА-редуктазой.

Рис. 27.5. Факторы, влияющие на баланс холестерола на клеточном уровне. Х — холестерол; ЭХ — эфиры холестерола; АХАТ – аци-СоА:холестерол ацилтрансфераза, ЛХАТ — лецитин:холестерол ацилтрансфераза; А-I — апобелок А-I, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности.

чении содержания холестерола в пище полного прекращения синтеза холестерола в организме не происходит. По-видимому, ингибируется лишь образование холестерола в печени. Опыты с перфузируемой печенью показали, что богатые холестеролом остатки хиломикронов (см. с. 264) ингибируют синтез холестерола.

Степень ингибирования биосинтеза холестерола под действием холестерола, поступающего с пищей, у людей различна. Однако, уменьшая количество холестерола в пище, можно снизить уровень холестерола в крови.

ТРАНСПОРТ ХОЛЕСТЕРОЛА

БАЛАНС ХОЛЕСТЕРОЛА В ТКАНЯХ

Факторы, влияющие на баланс холестерола на уровне тканей, приведены на рис. 27.5.

Увеличение содержания холестерола в тканях происходит при 1) захвате холестеролсодержащих липопротеинов специальными рецепторами, например рецепторами ЛПНП; 2) захвате холестеролсодержащих липопротеинов без участия рецепторов; 3) захвате свободного холестерола, содержащегося в богатых холестеролом липопротеинах, клеточными мембранами; 4) синтезе холестерола; 5) гидролизе эфиров холестерола, катализируемом **гидролазой эфиров холестерола**.

Уменьшение содержания холестерола наблюдается при 1) переходе холестерола из мембран в липопротеины с низким содержанием холестерола, в частности в $ЛПВП_3$ или новообразуемые ЛПВП (этот переход промотируется лецитин:холестерол ацилтрансферазой, **ЛХАТ**; 2) эстерификации холестерола, катализируемой **АХАТ** (ацил-СоА:холестеролацилтрансферазой), и 3) использовании холестерола для синтеза других стероидов, в частности гормонов или желчных кислот в печени.

Рецептор ЛПНП (рецептор апо-В-100, Е)

В нормальных клетках рецепторы ЛПНП взаимодействуют с лигандом апо-В-100 на ЛПНП, после чего интактный ЛПНП захватывается клеткой путем эндоцитоза. В лизосомах ЛПНП распадается; эфиры холестерола при этом гидролизуются, а свободный холестерол выходит в цитоплазму, где ингибирует ГМГ-СоА-редуктазу и de novo синтез холе-

стерола и активирует АХАТ. Количество рецепторов ЛПНП на поверхности клетки, по-видимому, регулируется в зависимости от потребности клетки в холестероле, необходимом для образования мембран и биосинтеза стероидных гормонов. При повышении концентрации холестерола в клетке уменьшается количество рецепторов ЛПНП (рис. 27.5).

Рецептор апо-В-100, Е является «высокоаффинным» рецептором ЛПНП, который легко насыщается в физиологических условиях. На мембране клеток имеются также и «низкоаффинные» рецепторы ЛПНП.

ТРАНСПОРТ ХОЛЕСТЕРОЛА МЕЖДУ ТКАНЯМИ (рис. 27.6)

У людей содержание холестерола в плазме крови составляет около 200 мг/100 мл; оно увеличивается с возрастом. При этом отмечены значительные индивидуальные различия в содержании холестерола. Большая часть холестерола находится в эстерифицированной форме. Он переносится в плазме крови в составе липопротеинов. Наибольшая доля холестерола находится на ЛПНП (β-липопротеинах). Однако в случае количественного преобладания ЛПОНП доля холестерола этой фракции оказывается преобладающей.

По данным опытов с радиоактивной меткой холестерол, поступивший с пищей, приходит в равновесие с холестеролом плазмы через несколько дней, а холестеролом тканей — через несколько недель. Период полуобновления холестерола в печени относительно непродолжителен, но для организма в целом он составляет несколько недель. Равновесие между свободным холестеролом плазмы крови и печени достигается за несколько часов.

Эфиры холестерола, поступившие с пищей, гидролизуются до свободного холестерола, который

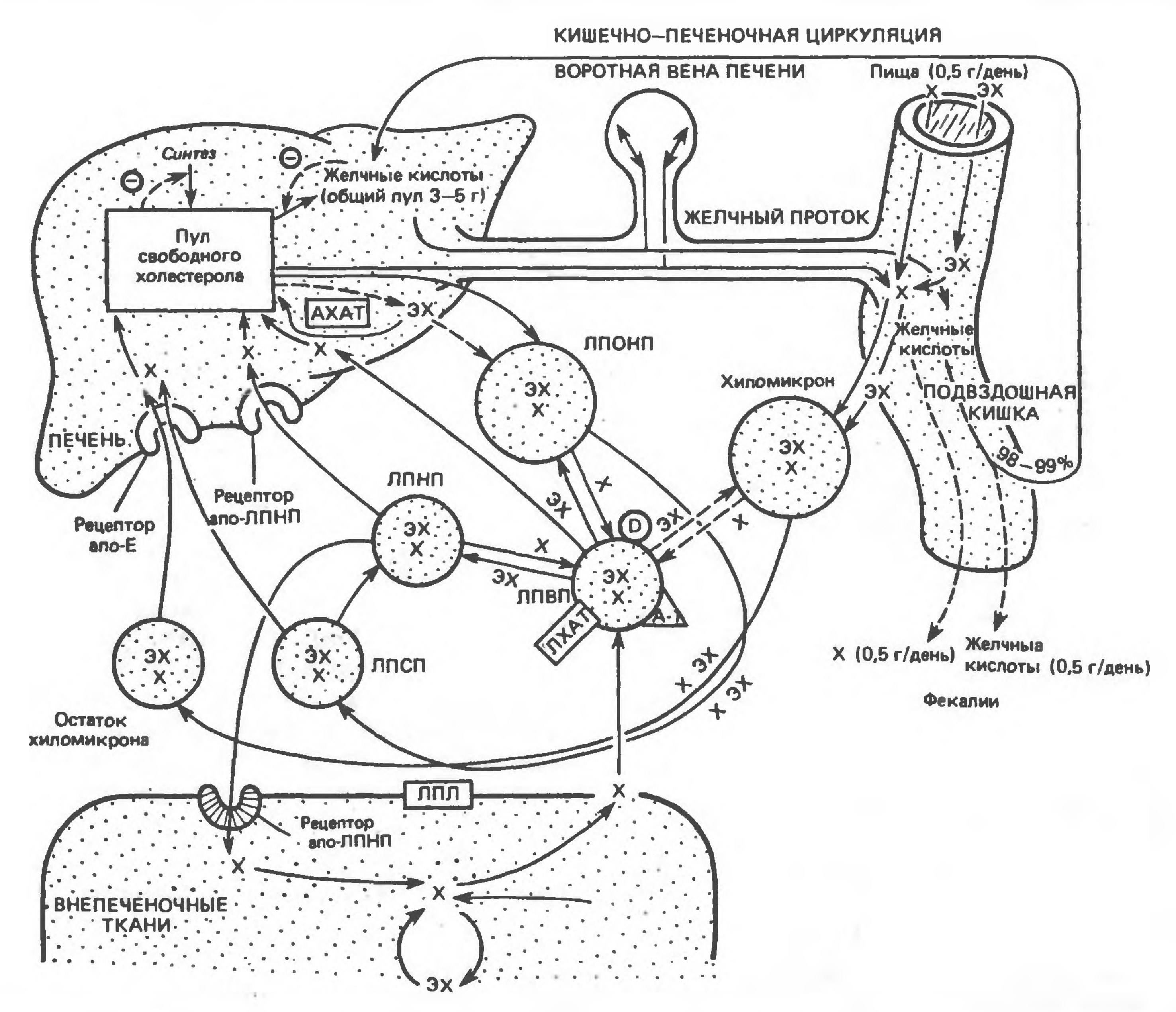


Рис. 27.6. Транспорт холестерола между тканями в организме человека. Х — свободный холестерол; ЭХ — эфиры холестерола; ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности; ЛПСП — липопротеины средней плотности; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; ЛПВП — липопротеины высокой плотности; АХАТ — ацил-СоА:холестеролацилтрансфераза; ЛХАТ — лецитин:холестеролацилтрансфераза; А-I — апобелок А-I; D — апобелок D; ЛПЛ — липопротеинлипаза.

смешивается с поступившим свободным холестеролом и холестеролом, содержащимся в желчи, перед абсорбцией вместе с другими липидами. Далее он смешивается с холестеролом, синтезированном в кишечнике, и встраивается в хиломикроны. 80—90% абсорбированного холестерола эстерифицируется длинноцепочечными жирными кислотами в слизистой оболочке кишечника. Плохо всасываются стеролы растительного происхождения (ситостеролы). Когда хиломикроны атакуются липопротеинлипазой и образуются их остатки, теряется лишь 5% эфиров холестерола. После взаимодействия с рецепторами апо-Е остатки хиломикронов поступают в печень, где эфиры холестерола гидролизуются до свободного холестерола. Образующиеся в печени ЛПОНП переносят холестерол в плазму крови. У человека, однако, из-за низкой активности АХАТ в печени холестерол поступает в плазму в составе ЛПОНП преимущественно в свободном виде. Эфиры холестерола, находящиеся в ЛПОНП, образуются главным образом за счет действия ЛХАТ плазмы крови. Бо́льшая часть холестерола, находящегося в ЛПОНП, остается и в остатках ЛПОНП, которые либо поглощаются печенью, либо превращаются в ЛПНП. Последние в свою очередь связываются специфическими рецепторами печени и внепеченочных тканей.

Роль ЛХАТ

Активность ЛХАТ плазмы у человека обеспечивает образование эфиров холестерола. (Другая картина наблюдается у ряда животных, например у крыс, у которых в печени функционирует весьма активная АХАТ, обеспечивающая значительный экспорт эфиров холестерола в составе новообразовавшихся ЛПОНП.) Активностью ЛХАТ обладают ЛПВП, содержащие апобелок-A-I. При эстерификации холестерола в составе ЛПВП возникает градиент концентрации свободного холестерола, за счет которого из тканей и других липопротеинов холестерол поступает в ЛПВП (рис. 27.6). Плотность ЛПВП уменьшается, и он превращается в ЛПВП$_2$, который и поставляет холестерол в печень (рис. 26.6). Таким образом, ЛПВП эффективно участвует в **обратном транспорте холестерола**, т. е. осуществляют перенос его из тканей в печень.

Роль белка — переносчика эфиров холестерола

Этот белок, находящийся в плазме крови человека (у крыс он отсутствует), входит в состав ЛПВП и, по-видимому, идентичен апобелку-D. Он ускоряет перенос эфиров холестерола от ЛПВП к ЛПОНП, ЛПНП и, в меньшей степени, к хиломикронам. Следовательно, белок — переносчик эфиров холестерола способствует снижению ингибирования ЛХАТ, связанной с ЛПНП, продуктом реакции. Таким образом, у человека большая часть эфиров холестерола, образовавшихся при действии ЛХАТ в ЛПВП, поступает в печень в составе остатков ЛПОНП (ЛПСП) или ЛПНП (рис. 26.6).

В конечном счете весь холестерол, который должен быть выведен из организма, поступает в печень и экскретируется с желчью либо в виде холестерола, либо в виде солей желчных кислот.

ВЫВЕДЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА И ОБРАЗОВАНИЕ СОЛЕЙ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ

Из организма человека ежедневно выводится около 1 г холестерола. Приблизительно половина этого количества экскретируется с фекалиями после превращения в желчные кислоты. Оставшаяся часть выводится в виде нейтральных стероидов. Большая часть холестерола, поступившего в желчь, реабсорбируется; считается, что по крайней мере часть холестерола, являющегося предшественником фекальных стеролов, поступает из слизистой оболочки кишечника. Основным фекальным стеролом является **копростанол**, который образуется из холестерола в нижнем отделе кишечника под действием присутствующей в нем микрофлоры. Значительная доля солей желчных кислот, поступающих с желчью, всасывается в кишечнике и через воротную вену возвращается в печень, где снова поступает в желчь. Этот путь транспорта солей желчных кислот получил название **кишечно-печеночной циркуляции**. Оставшаяся часть солей желчных кислот, а также их производные выводятся с фекалиями. Под действием кишечных бактерий первичные желчные кислоты превращаются во вторичные.

БИОСИНТЕЗ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ

Первичные желчные кислоты синтезируются в печени из холестерола через ряд промежуточных соединений. Среди желчных кислот доминирует в количественном отношении холевая кислота. Холевая и **хенодезоксихолевая** кислоты имеют общего предшественника, образующегося из холестерола (рис. 27.7).

Первым этапом биосинтеза желчных кислот является 7α-гидроксилирование холестерола, и именно эта реакция является скорость-определяющей в процессе биосинтеза желчных кислот. Она катализируется микросомальным ферментом **7α-гидроксилазой** и протекает с участием кисло-

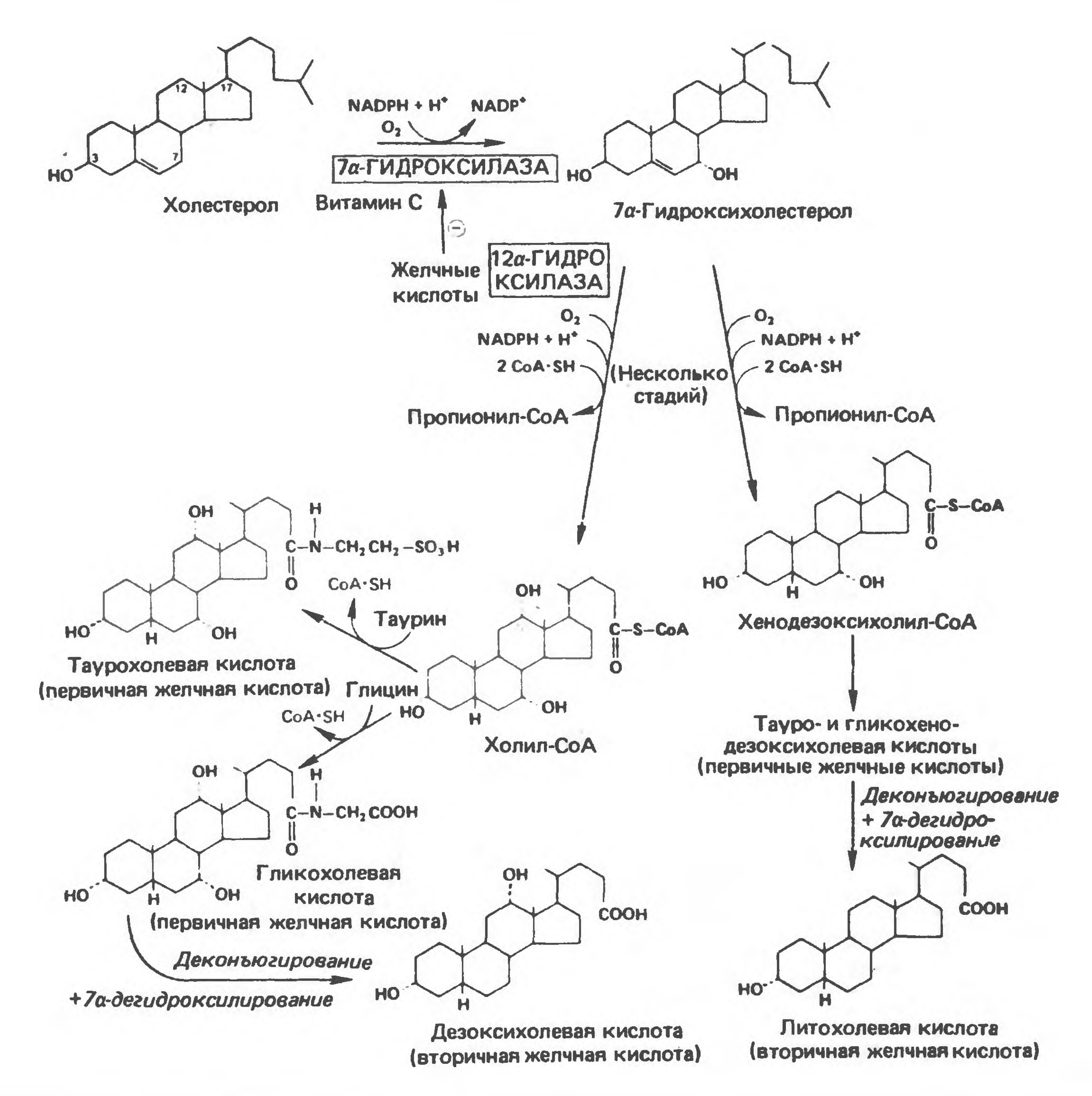


Рис. 27.7. Биосинтез и распад желчных кислот. Звездочками обозначены реакции, катализируемые ферментами микроорганизмов.

рода, NADPH и цитохрома P-450. 7α-Гидролаза является типичной монооксигеназой, как и ферменты последующих стадий гидроксилирования. При недостатке витамина С образование желчных кислот на стадии 7α-гидроксилирования тормозится, что и приводит к накоплению холестерола; у больных цингой морских свинок развивается атеросклероз.

Путь биосинтеза желчных кислот разветвляется на ранней стадии: одна из ветвей приводит к образованию **холевой кислоты**, имеющей дополнительную α-OH-группу в положении 12, а другая — к образованию **хенодезоксихолевой кислоты**; в остальном обе ветви сходны и включают реакции гидроксилирования и укорачивания боковой цепи (рис. 27.7), в результате образуются характерные для желчных кислот структуры, содержащие α-OH-группы в положениях 3 и 7 и полностью насыщенное стероидное ядро.

В норме желчные кислоты поступают в желчь в виде конъюгатов с глицином и таурином. Считается, что новообразовавшиеся желчные кислоты находятся в клетках печени в виде эфиров CoA, т. е. в виде холил- или хенодезоксихолил-CoA (рис. 27.7). CoA-производные желчных кислот образуются под действием активирующего фермента, локализованного в микросомах клеток печени. Другой фермент катализирует конъюгирование CoA-производных с глицином или таурином с образованием гликохолевой или таурохенодезоксихолевой кислот, которые являются первичными желчными кислотами. У человека соотношение конъюгатов желчных ки-

слот с глицином и таурином составляет в норме 3:1.

Поскольку желчь содержит значительное количество ионов натрия и калия и имеет щелочную реакцию, то принято рассматривать желчные кислоты и их конъюгаты в форме солей, откуда и возник термин «желчные соли».

В кишечнике часть первичных желчных кислот под действием кишечных бактерий подвергается деконъюгированию и 7α-дегидроксилированию, в результате чего образуются **вторичные желчные кислоты**: из холевой кислоты — дезоксихолевая кислота и из хенодезоксихолевой кислоты — литохолевая кислота (рис. 27.7).

КИШЕЧНО-ПЕЧЕНОЧНАЯ ЦИРКУЛЯЦИЯ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ

Продукты переваривания липидов, в том числе и холестерол, всасываются в верхнем отделе тонкого кишечника (первые 100 см), однако первичные и вторичные желчные кислоты всасываются практически только в подвздошной кишке, и 98—99% желчных кислот, поступивших в кишечник, возвращается через систему воротной вены в печень. Этот цикл желчных кислот носит название кишечно-печеночной циркуляции. Следует отметить, что вследствие плохой растворимости литохолевая кислота практически не реабсорбируется в кишечнике.

Небольшая часть солей желчных кислот, приблизительно 500 мг/сут, не абсорбируется и выводится из организма с фекалиями. Несмотря на то что по этому пути выводится сравнительно небольшое количество желчных кислот, он является основным путем выведения холестерола. Кишечно-печеночная циркуляция солей желчных кислот протекает весьма эффективно. Хотя в организме циркулирует относительно небольшой пул желчных кислот (около 3—5 г), однако за сутки он 6—10 раз проходит через кишечник. При этом доля выводимых желчных кислот невелика, т. е. приблизительно 1—2% желчных кислот за один цикл в системе кишечно-печеночной циркуляции. **Для восполнения потери желчных кислот, выводимых с фекалиями, в печени постоянно осуществляется синтез de novo желчных кислот из холестерола в количестве, эквивалентном выводимому**; в результате пул желчных кислот остается постоянным. Регуляция этого процесса осуществляется по принципу обратной связи.

Регуляция синтеза желчных кислот

Скорость-лимитирующей стадией при биосинтезе желчных кислот является реакция, катализируемая 7α-гидроксилазой, а при биосинтезе холестерола — реакция, катализируемая ГМГ-СоА-редуктазой (рис. 27.1). Часто активности этих двух ферментов изменяются одновременно, и поэтому весьма трудно установить, на какой именно стадии ингибируется синтез желчных кислот: на стадии, катализируемой ГМГ-СоА-редуктазой, или же на стадии, катализируемой 7α-гидроксилазой. В течение суток активность обоих ферментов изменяется сходным образом. Еще не выяснено, оказывает ли холестерол прямое стимулирующее действие на 7α-гидроксилазу. Желчные же кислоты ингибируют 7α-гидролазу по принципу обратной связи (но вряд ли это ингибирование осуществляется по прямому аллостерическому механизму). В связи с этим возвращение желчных кислот в печень через систему кишечно-печеночной циркуляции оказывает важное регуляторное действие; прерывание циркуляции приводит к активации 7α-гидроксилазы. Важно учитывать, что 7α-гидроксилаза и ГМГ-СоА-редуктаза могут регулироваться путем фосфорилирования-дефосфорилирования. Фосфорилирование 7α-гидроксилазы увеличивает ее активность; напротив, ГМГ-СоА-редуктаза более активна в дефосфорилированном состоянии.

КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Гиперхолестеролемию можно лечить путем прерывания кишечно-печеночной циркуляции желчных кислот. Согласно имеющимся данным, таким способом удается добиться значительного снижения уровня холестерола в плазме крови. Кишечно-печеночную циркуляцию можно прервать либо путем приема холестираминовой смолы (Questran), либо хирургическим способом — путем выключения подвздошной кишки. В обоих случаях блокируется реабсорбция желчных кислот. В результате снимается ингибирование по типу обратной связи, вызываемое в норме желчными кислотами, и значительно большее количество холестерола в печени превращается в желчные кислоты для поддержания постоянного размера пула желчных кислот. Количество рецепторов ЛПНП в печени в результате регуляторных процессов возрастает; соответственно увеличивается захват ЛПНП и понижается содержание холестерола в плазме крови.

Холестерол, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца

Многие исследователи отметили, что у людей наблюдается корреляция между повышением уровня липидов в сыворотке крови и частотой заболеваний ишемической болезнью сердца и атеросклерозом. Принято считать, что среди липидов сыворотки крови основным фактором, способствующим возникновению этих заболеваний, является холестерол. Однако отмечена также корреляция вероятности развития рассматриваемых заболеваний с концентрацией триацилглицеролов. У пациентов, страдающих ате-

росклерозом артерий, могут наблюдаться следующие отклонения: 1) повышение концентрации ЛПОНП при нормальной концентрации ЛПНП; 2) повышение уровня ЛПНП при нормальной концентрации ЛПОНП; 3) повышение концентраций обеих фракций липопротеинов. Существует также обратная зависимость между концентрацией ЛПВП ($ЛПВП_2$) и вероятностью ишемической болезни сердца; высказана точка зрения, согласно которой наиболее показательным при данном заболевании является **отношение содержания холестерола во фракциях ЛПНП и ЛПВП**. Это согласуется с представлением о функционировании ЛПНП как переносчиков холестерола в ткани, а ЛПВП — как переносчиков холестерола из тканей.

При атеросклерозе происходит отложение в соединительной ткани стенок артерий холестерола и его эфиров, поступающих с липопротеинами, содержащими апо-В-100. При заболеваниях, для которых характерно длительное повышение уровней ЛПОНП, ЛПСП или ЛПНП в крови (например, при сахарном диабете, липоидном нефрозе, гипотиреозе и других состояниях, сопровождающихся гиперлипидемией), часто отмечается преждевременный атеросклероз или атеросклероз в тяжелой форме.

Опыты по индуцированию атеросклероза у животных показали, что разные виды подвержены этому заболеванию в разной степени. Так, у кроликов, свиней, обезьян, а также у людей можно вызвать атеросклероз, давая им с пищей большие количества холестерола, тогда как крысы, собаки и кошки оказались резистентными. Однако у собак и крыс удается индуцировать атеросклероз после удаления щитовидной железы или на фоне введения им тиоурацила. Характерным признаком гипертиреоза является низкий уровень холестерола в крови.

Концентрация холестерола в крови у различных индивидуумов сильно зависит от наследственных факторов.

Большое внимание уделялось замене содержащихся в пище насыщенных жирных кислот на **полиненасыщенные жирные кислоты** как фактору, вызывающему снижение уровня холестерола в крови. Богатые линолевой кислотой растительные масла, например арахисовое, хлопковое, кукурузное, соевое, способствуют снижению уровня холестерола в плазме крови, в то время как потребление сливочного масла, говяжьего жира и кокосового масла, которые содержат преимущественно насыщенные жирные кислоты, приводит к его повышению. Сахароза и фруктоза в большей степени, чем другие углеводы, способствуют повышению уровня липидов, в первую очередь триацилглицеролов, в крови.

Механизм снижения уровня холестерола полиненасыщенными жирными кислотами пока не выяснен. Было выдвинуто несколько гипотез, объясняющих их действие; одна из них предполагает стимуляцию экскреции холестерола в кишечник, а другая — активацию окисления холестерола до желчных кислот. Возможно, что в печени и других тканях метаболизм эфиров холестерола, образованных полиненасыщенными жирными кислотами, происходит быстрее, в результате чего увеличивается скорость их обновления и выведения. Согласно другим представлениям, действие полиненасыщенных жирных кислот в значительной мере обусловлено увеличением скорости катаболизма ЛПНП, в результате чего происходит изменение распределения холестерола между плазмой крови и тканями в пользу последних. Насыщенные жирные кислоты инициируют образованию ЛПОНП, содержащих относительно большое количество холестерола. Эти частицы медленнее утилизируются внепеченочными тканями, чем более крупные частицы.

Развитию ишемической болезни сердца способствует также высокое кровяное давление, курение, ожирение, отсутствие физической нагрузки и употребление мягкой воды вместо жесткой. Повышение уровня свободных жирных кислот в плазме крови приводит к усилению секреции печенью ЛПОНП и соответственно к поступлению дополнительных количеств триацилглицеролов и холестерола в кровоток. К факторам, вызывающим повышение или колебание уровня свободных жирных кислот, относятся эмоциональный стресс, никотин, поступающий в организм при курении, употребление кофе, а также прием пищи с большими перерывами и в больших количествах. Многие из этих вредных факторов, по-видимому, не оказывают заметного действия на женщин, находящихся в предклимактерическом периоде. Это, возможно, связано с тем, что у этих женщин уровень ЛПВП в крови выше, чем у мужчин, а также у женщин в постклимактерическом периоде.

Гиполипидемические лекарственные препараты

Если не удается снизить уровень липидов в сыворотке крови с помощью специальной диеты, можно прибегнуть к гиполипидемическим лекарственным препаратам. Известно несколько препаратов, блокирующих образование холестерола на различных стадиях метаболического пути. Многие гиполипидемические препараты оказывают неблагоприятное действие на организм. Однако ингибиторы ГМГ-СоА-редуктазы — **компактин** и **мевинолин**, полученные из грибов, снижают уровень холестерола ЛПНП, практически не оказывая нежелательных побочных эффектов. Гипохолестеролемический препарат **ситостерол** блокирует всасывание холестерола в желудочно-кишечном тракте. Ионообменные смолы **холестипол** и **холестирамин** (Questran) связывают соли желчных кислот, препятствуют их реабсорбции и тем самым способствуют их выведению с фекалия-

ми. **Неомицин** также ингибирует реабсорбцию солей желчных кислот. Гиполипидемический эффект **клофибрата** и **гемфиброзила** по крайней мере частично обусловлен переключением потока свободных жирных кислот, поступающих в печень, с пути их эстерификации на путь окисления, что приводит к уменьшению секреции триацилглицерол- и холестеролсодержащих ЛПОНП клетками печени. Кроме того, эти препараты ускоряют гидролиз триацилглицеролов ЛПОНП, катализируемый липопротеинлипазой. **Пробукол**, по-видимому, усиливает катаболизм ЛПНП по рецептор-независимому пути. **Никотиновая кислота** уменьшает поток СЖК, ингибируя липолиз в жировой ткани, и тем самым тормозит образование ЛПОНП клетками печени.

Нарушение обмена липопротеинов плазмы крови (дислипопротеинемии)

У небольшого числа людей наблюдаются наследственные нарушения обмена липопротеинов, приводящие к первичной **гипер-** или **гиполипопротеинемии**. У пациентов, страдающих сахарным диабетом, гипотиреозом и атеросклерозом, наблюдаются нарушения обмена липопротеинов, сходные с теми, которые характерны для наследственных форм дислипопротеинемии. Причиной практически всех наследственных форм заболеваний является нарушение одной из стадий синтеза, транспорта или деструкции липопротеинов (см. рис. 26.4, 26.5 и 27.6). Следует отметить, что не все наследственные нарушения обмена липопротеинов представляют серьезную опасность для здоровья пациента.

А. Гиполипопротеинемия

1. **Абеталипопротеинемия**. Это редкое наследственное заболевание связано с отсутствием β-липопротеинов (ЛПНП) в плазме крови. Для больных абеталипопротеинемией характерен низкий уровень липидов в плазме, особенно ацилглицеролов, которые практически отсутствуют, что является следствием **нарушения образования хиломикронов и ЛПОНП**. Ацилглицеролы накапливаются в кишечнике и печени. В основе данного заболевания лежит нарушение синтеза апобелка-В.

2. **Семейная гипобеталипопротеинемия**. При этом заболевании концентрация ЛПНП составляет от 10 до 50% от концентрации ЛПНП у здоровых людей, однако организм способен образовывать хиломикроны. Сопоставление с состоянием при абеталипротеинемии позволяет заключить, что апо-В играет важную роль в транспорте триацилглицеролов. Большинство людей с гипобеталипопротеинемией не жалуются на состояние здоровья и доживают до преклонного возраста.

3. **Семейная недостаточность альфа-липопротеинов (болезнь Тангира).** У гомозиготных больных в плазме крови практически отсутствуют ЛПВП, а в тканях накапливаются большие количества эфиров холестерола. Нарушений образования хиломикронов и секреции ЛПОНП клетками печени не наблюдается. Однако электрофорез липопротеинов выявляет отсутствие пре-β-липопротеинов, а полоса, соответствующая β-липопротеинам, шире обычной и содержит эндогенные триацилглицеролы. Полоса в области пре-β-липопротеинов содержит другие апобелки, источником которых в норме являются ЛПВП. У пациентов отсутствует апобелок-С-II, являющийся активатором липопротеинлипазы, с чем связано характерное для данного состояния повышение уровня триацилглицеролов в плазме крови.

Б. Гиперлипопротеинемия

1. **Семейная недостаточность липопротеинлипазы (тип I)**. Это состояние характеризуется очень медленным выведением из кровотока хиломикронов, в результате они накапливаются в крови. Уровень ЛПНОП может быть выше нормы, а уровни ЛПНП и ЛПВП ниже. Состояние индуцируется пищей, богатой жирами. Лечение заключается в соблюдении диеты с низким содержанием жиров и высоким содержанием сложных углеводов. Одна из форм данного состояния связана с недостатком апобелка-С-II, являющегося кофактором липопротеинлипазы.

2. **Семейная гиперхолестеролемия (тип II).** У пациентов с данным заболеванием наблюдается повышение уровня β-липопротеинов (ЛПНП), которое обусловлено увеличением общего содержания холестерола в плазме. При гиперхолестеролемии типа II b возможно также повышение уровня ЛПОНП; в связи с этим может быть несколько повышен общий уровень триацилглицеролов, но в отличие от других типов гиперлипопротеинемии сыворотка крови остается прозрачной. Обычно происходит отложение жиров в тканях (например, ксантомы, атеромы). Гиперхолестеролемия типа II может развиваться как вторичное явление при гипотиреозе. Заболевание, по-видимому, связано с уменьшением скорости выведения ЛПНП из кровотока из-за **нарушения рецепции ЛПНП**; вероятность атеросклероза увеличена. При лечении назначают диету с низким содержанием холестерола и насыщенных жиров. При **болезни Волмана** (патологическое накопление эфиров холестерола) также развивается гиперхолестеролемия, которая обусловлена снижением активности гидролазы эфиров холестерола в лизосомах таких клеток, как фибробласты, в которых в норме происходит метаболизм ЛПНП.

3. **Семейная гиперлипопротеинемия, тип III («синдром широкой полосы β-липопротеинов», дефект удаления остатков липопротеинов, семейная дисбеталипопротеинемия).** Данное состояние характеризуется увеличением содержания отстатков ЛПОНП. Плот-

ность этих липопротеинов меньше 1,019. На электрофореграмме они обнаруживаются в виде широкой β-полосы (β-ЛПОНП). Состояние сопровождается гиперхолестеролемией и гипертриацилглицеролемией; наблюдаются ксантомы и атеросклеротическое поражение как периферийных, так и коронарных артерий. Лечение проводят диетотерапией, направленной на уменьшение веса. Рекомендуется пища, содержащая сложные углеводы, ненасыщенные жиры и очень незначительное количество холестерола. В основе заболевания лежит **нарушение метаболизма остатков липопротеинов в печени из-за дефекта в апобелке** Е (в норме этот белок представлен тремя изоформами: Е2, Е3 и Е4). У больных гиперлипопротеинемией типа III обнаружен только апобелок-Е2, который не способен связываться с рецепторами апо-Е.

4. **Семейная гипертриацилглицеролемия (тип IV).** Состояние характеризуется высоким уровнем эндогенно образованных триацилглицеролов (ЛПОНП). Параллельно с увеличением уровня триацилглицеролов возрастает концентрация холестерола. Заболевание часто сопровождается понижением толерантности к глюкозе, количество ЛПНП и ЛПВП ниже нормы. Данное состояние часто наблюдается при ишемической болезни сердца, инсулиннезависимом сахарном диабете типа II, ожирении и ряде других заболеваний, а также при алкоголизме и приеме прогестагенов. Лечение первичной гиперлипопротеинемии типа IV проводят путем диетотерапии, направленной на снижение веса; в рацион пациентов вместо растворимых углеводов вводят сложные углеводы, они получают ненасыщенные жиры и очень незначительное количество холестерола. Для лечения используют также гиполипидемические препараты.

5. **Семейная гиперлипопротеинемия типа V.** При данном состоянии изменения фракций липопротеинов носят весьма сложный характер; увеличено содержание как хиломикронов, так и ЛПОНП, в результате наблюдается триацилглицеролемия и холестеролемия, а концетрации ЛПНП и ЛПВП ниже нормы. Часто образуются ксантомы, однако атеросклероз развивается не во всех случаях. Пониженная толерантность к глюкозе часто сочетается с ожирением и сахарным диабетом. Причины данного наследственного состояния пока не выяснены. Лечение направлено на снижение веса и включает диету с невысоким содержанием углеводов и жиров.

6. **Семейная гиперальфалипопротеинемия.** Это редкое состояние связано с увеличением концентрации ЛПВП, что, вероятно, благоприятно сказывается на состоянии здоровья человека.

В. Семейная недостаточность лецитин:холестеролацилтрансферазы (ЛХАТ)

В плазме крови пациентов наблюдается низкий уровень эстерифицированного холестерола и лизолецитина, а концентрации холестерона и лецитина повышены. Плазма крови слегка мутная. Отмечены также отклонения в структуре липопротеинов. Одна из фракций ЛПВП содержит дискоидальные структуры, расположенные в виде «монетных столбиков», которые представляют собой новообразовавшиеся ЛПВП, не способные включать в свой состав холестерол из-за отсутствия ЛХАТ. Имеется также субфракция ЛПНП (липопротеин-Х), которая в других случаях обнаруживается только у пациентов с **холестазом** (застоем желчи). Кроме того, в данном случае ЛПОНП отличаются от обычных — при электрофорезе они движутся как β-липопротеины (β-ЛПОНП). У пациентов с **паренхиматозным поражением печени** также обнаружено снижение активности ЛХАТ и изменения липидов и липопротеинов сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА

Brown M. S., Goldstein J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, Annu. Rev. Biochem., 1983, **52**, 223.

Connor W. E., Connor S. L. The dietary treatment of hyperlipidemia, Med. Clin. North Am., 1982, **66**, 485.

Eisenberg S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism, Klin. Wochenschr., 1983, **61**, 119.

Fears R., Sabine J. R. (eds) Cholesterol 7 α-Hydroxylase (7 α-Monooxygenase). CRC Press, 1986.

Fielding C. J., Fielding P. E. Metabolism of cholesterol and lipoproteins. Page 404 in: Biochemistry of Lipids and Membranes. Vance D. E., Vance J. E. (eds) Benjamin/Cummings. 1985.

Frochlich J., McLeod R., Hon K. Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), Clin. Bioche., 1982, **15**, 269.

Kane J. B., Havel R. J. Treatment of hypercholesterolemia, Annu. Rev. Med., 1986, **37**, 427

Mahley R. W., Innerarity T. L. Li[illegible]ptors and cholesterol homeostasis, Biochi[illegible] Acta., 1983, **737**, 197.

Глава 28

Регуляция метаболизма липидов и источники энергии в тканях

Питер Мейес

ВВЕДЕНИЕ

Липиды выполняют многие структурные и метаболические функции, но основная их роль в обмене веществ и поддержании здоровья — это поставка значительной доли пищевых калорий (~ 40% в «западной» диете). Особый интерес представляет регуляция этого энергетического потока и пути интеграции его с другими источниками энергии в тканях, поскольку с этими потоками связаны различные метаболические процессы.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В условиях положительного калорийного баланса значительная часть потенциальной энергии пищевых продуктов запасается в виде энергии гликогена или жира. Во многих тканях даже при нормальном питании, не говоря уже о состояниях калорийного дефицита или голодания, окисляются преимущественно жирные кислоты, а не глюкоза. Причина этого — необходимость сохранения глюкозы для тех тканей (например, для мозга или эритроцитов), которые постоянно в ней нуждаются. Следовательно, регуляторные механизмы, часто с участием гормонов, должны обеспечивать постоянное снабжение всех тканей подходящим топливом в условиях как нормального питания, так и голодания. Сбой в этих механизмах происходит при гормональном дисбалансе (например, в условиях недостатка инсулина при диабете), при нарушении метаболизма в период интенсивной лактации (например, при кетозе крупного рогатого скота) или из-за усиления обменных процессов при беременности (например, при токсикозе беременности у овец). Такие состояния представляют собой патологические отклонения при синдроме голодания; он наблюдается при многих заболеваниях, сопровождающихся снижением аппетита.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЖИРНЫХ КИСЛОТ (ЛИПОГЕНЕЗА)

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ЛИПОГЕНЕЗ

Многие животные, как и человек, питаются с интервалами, вследствие этого возникает необходимость запасания большей части энергии, полученной с пищей, для использования ее в промежутках между приемами пищи. В процессе липогенеза происходит превращение глюкозы и промежуточных продуктов ее метаболизма (пирувата, лактата и ацетил-СоА) в жир; это — анаболическая фаза цикла. **Главный фактор, контролирующий скорость липогенеза, — состояние питания** организма и тканей. Так, высокая скорость липогенеза наблюдается у хорошо питающегося животного, в рационе которого значительную долю составляют углеводы. Скорость липогенеза снижается при ограниченном поступлении калорийной пищи в организм, а также при богатой жирами диете или в случае недостатка инсулина (как это имеет место при сахарном диабете). При всех этих состояниях повышается уровень свободных жирных кислот в плазме крови. Регуляция мобилизации свободных жирных кислот из жировой ткани рассмотрена в гл. 26.

Существует **обратная связь между липогенезом в печени и концентрацией свободных жирных кислот в сыворотке крови** (рис. 28.1). Сильное ингибирование липогенеза происходит при повышении концентрации свободных жирных кислот в диапазоне 0,3 — 0,8 мкмоль/мл плазмы, который характерен для перехода от сытого состояния к голодному, когда уровень свободных жирных кислот в плазме крови увеличивается. Содержащиеся в пище жиры подавляют липогенез в печени, и, если содержание жира в пище превышает 10%, лишь незначительная часть

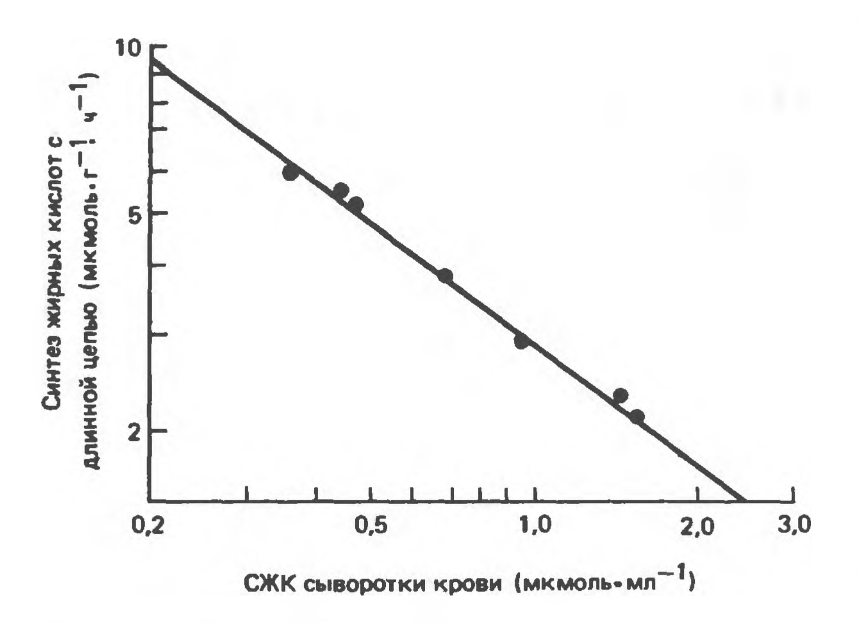


Рис. 28.1. Прямое ингибирование липогенеза в печени свободными жирными кислотами. Скорость липогенеза определяли по количеству ^3H из ^3H_2O, включившегося в длинноцепочечные жирные кислоты в перфузируемой печени крыс. СЖК — свободные жирные кислоты. (Опыты проводились совместно с D.L. Topping в лаборатории автора.)

поглощенных углеводов превращается в жиры. Интенсивность липогенеза возрастает при потреблении сахарозы вместо глюкозы, поскольку фруктоза минует регуляторную стадию гликолиза, катализируемую фосфофруктокиназой (рис. 21.2).

Поскольку имеется тесная связь между активностью пентозофосфатного пути, с одной стороны, и пути липогенеза, с другой, то первоначально полагали, что блокирование липогенеза при голодании обусловлено недостатком NADPH, образующегося при функционировании пентозофосфатного пути. Однако последующие работы показали, что добавление NADPH-генерирующей системы к гомогенату печени голодных крыс не вызывает усиления синтеза жирных кислот.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ЛИПОГЕНЕЗ

Быстрая регуляция синтеза длинноцепочечных жирных кислот осуществляется путем алостерической и ковалентной модификации ферментов, а медленная регуляция — путем изменения скорости синтеза и деградации ферментов.

Регуляция ацетил-СоА-карбоксилазы

В настоящее время установлено, что **реакция, катализируемая ацетил-СоА-карбоксилазой,** является скорость-лимитирующей на пути липогенеза (см. рис. 23.5). Ацетил-СоА-карбоксилаза активируется **цитратом** и ингибируется длинноцепочечными молекулами ацил-СоА, это является примером ингибирования метаболического пути конечным продуктом по принципу обратной связи. Так, если ацил-СоА накапливается, не успевая вступить в реакцию этерификации с соответствующими субстратами, он автоматически уменьшает синтез новых молекул жирных кислот. Точно так же при накоплении ацил-СоА в результате усиления процесса липолиза или увеличения поступления свободных жирных кислот в ткани происходит ингибирование синтеза жирных кислот de novo. Ацил-СоА может также ингибировать **трикарбоксилат-транспортирующую** систему митохондрий, препятствуя тем самым выходу цитрата из митохондрии в цитозоль.

Регуляция пируватдегидрогеназы

Существует также обратная связь между концентрацией свободных жирных кислот и отношением активной и неактивной форм пируватдегидрогеназы, благодаря которой осуществляется регуляция образования ацетил-СоА, необходимого для липогенеза. Ацил-СоА тормозит активность пируватдегидрогеназы путем ингибирования ATP-ADP-транслокатора внутренней митохондриальной мембраны, в результате внутри митохондрий происходит увеличение отношения [ATP]/[ADP], это приводит к превращению активной формы пируватдегидрогеназы в неактивную (рис. 22.3). Окисление жирных кислот, обусловленное повышением их уровня, приводит к увеличению отношений [ацетил-СоА]/[СоА] и [NADH]/[NAD^+] в митохондриях и тем самым к ингибированию пируватдегидрогеназы.

Гормональная регуляция

Существует несколько механизмов стимуляции липогенеза инсулином. Этот гормон ускоряет перенос глюкозы в клетки (например, в клетки жировой ткани) и тем самым способствует увеличению образования как пирувата, необходимого для синтеза жирных кислот, как и глицерол-3-фосфата, необходимого для эстерификации последних. Инсулин способствует переходу пируватдегидрогеназы из неактивной формы в активную в жировой ткани (но не в печени). Кроме того, инсулин способствует активации ацетил-СоА-карбоксилазы, вероятно, в результате активирования протеинфосфатазы. К тому же путем снижения уровня внутриклеточного сАМР инсулин ингибирует липолиз и тем самым снижает концетрацию длинноцепочечных ацил-СоА, которые являются ингибиторами липогенеза. **Глюкагон** и **адреналин** вызывают ингибирование ацетил-СоА-карбоксилазы и, следовательно, процесса липогенеза в целом путем увеличения уровня **сАМР**; в результате сАМР-зависимая протеинкиназа катализирует фосфорилирование ацетил-СоА-карбоксилазы и переводит последнюю в неактивную форму. Кроме того, катехоламины ингибируют ацетил-

СоА-карбоксилазу опосредованно при участии α-адренергических рецепторов и Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы. У жвачных исходным материалом для липогенеза является не глюкоза, а **ацетат**. Соответственно у этих животных не функционируют регуляторные механизмы липолиза, локализованные в митохондриях.

Адаптация ферментов

Как ферменты синтеза **жирных кислот**, так и **ацетил-СоА-карбоксилаза** являются адаптивными ферментами; количество их возрастает при усиленном питании и уменьшается при голодании, потреблении жира и диабете. Важную роль в индукции биосинтеза этих ферментов играет гормон **инсулин**. Обусловленная феноменом адаптации ферментов регуляция липогенеза развивается медленно и проявляется полностью только через несколько дней, усиливая прямое и немедленное действие жирных кислот и таких гормонов, как инсулин и глюкагон.

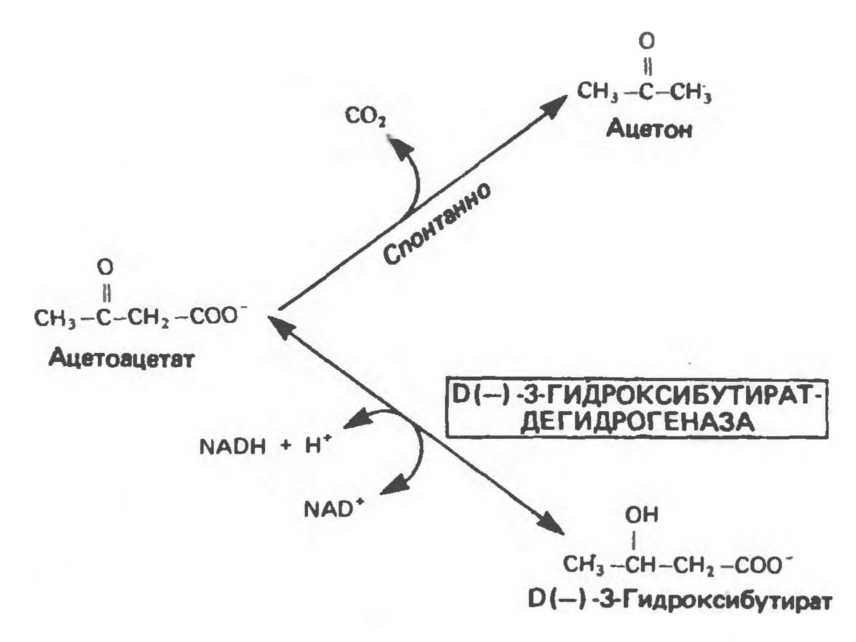


Рис. 28.2. Взаимопревращение кетоновых тел. D(—)-3-Гидроксибутиратдегидрогеназа является митохондриальным ферментом.

РЕГУЛЯЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

КЕТОГЕНЕЗ

В определенных метаболических условиях, когда происходит быстрое окисление жирных кислот, в печени образуются значительные количества **ацетоацетата** и **D(—)-3-гидроксибутирата** (β-гидроксибутирата), которые диффундируют в кровь. Ацетоацетат может спонтанно декарбоксилироваться с образованием **ацетона**. Эти три вещества известны под общим названием **кетоновые тела** (или ацетоновые тела), иногда их неправильно называют «кетоны»[1] (рис. 28.2). Обратимую реакцию превращения ацетоацетата в 3-гидроксибутират катализирует митохондриальный фермент D(—)-3-гидроксибутиратдегидрогеназа; равновесие регулируется отношением $[NAD^+]/[NADH]$ в митохондриях, т.е. **окислительно-восстановительным статусом.** Отношение [3-гидроксибутират]/[ацетоацетат] в крови колеблется между 1:1 и 10:1.

При хорошем питании концентрация кетоновых тел в крови млекопитающих в норме не превышает 1 мг/100 мл (в ацетоновых эквивалентах). У жвачных эта цифра несколько выше из-за образования в стенке рубца 3-гидроксибутирата из масляной кислоты в процессе ферментации. У человека обычно выводится с мочой менее 1 мг кетоновых тел в сутки. Состояние, которое характеризуется повышенным содержанием кетоновых тел в крови или моче, называют соответственно **кетонемией** (гиперкетонемией) или **кетонурией**. Общее состояние получило название—**кетоз**. Ацетоуксусная и 3-гидроксимасляная кислоты являются умеренно сильными кислотами, в крови или тканях они находятся в нейтрализованной форме. Длительное выведение этих кислот вызывает потерю буферных катионов (несмотря на образование аммиака почками), что приводит к истощению щелочного резерва и **кетоацидозу**. При неконтролируемом сахарном диабете кетоацидоз может иметь фатальные последствия.

Простейшая форма кетоза наблюдается при **голодании**; при этом происходит исчерпание запасов доступных углеводов, сопряженное с мобилизацией свободных жирных кислот. В качественном плане состояния кетоза, возникающие при различных состояниях, мало различаются. Значительные нарушения метаболизма, приводящие к патологическим состояниям, наблюдаются при диабете, токсикозе беременности у овец и кетозе лактирующих коров. Непатологические формы кетоза наблюдаются при богатой жиром диете и при тяжелых физических нагрузках в период после приема пищи.

У всех животных, кроме жвачных, печень является, по-видимому, единственным органом, поставляющим значительные количества кетоновых тел в кровь. Внепеченочные ткани используют их в качестве субстратов окислительных процессов. Внепеченочные источники кетоновых тел, функционирующие у жвачных при хорошем питании, практически не вызывают у них состояние кетоза.

Поток кетоновых тел из печени во внепеченочные

[1] Не следует пользоваться термином «кетоны крови», поскольку 3-гидроксибутират не является кетоном, кроме того, в крови содержится ряд кетонов, не относящихся к кетоновым телам, например пируват и фруктоза.

10 1573

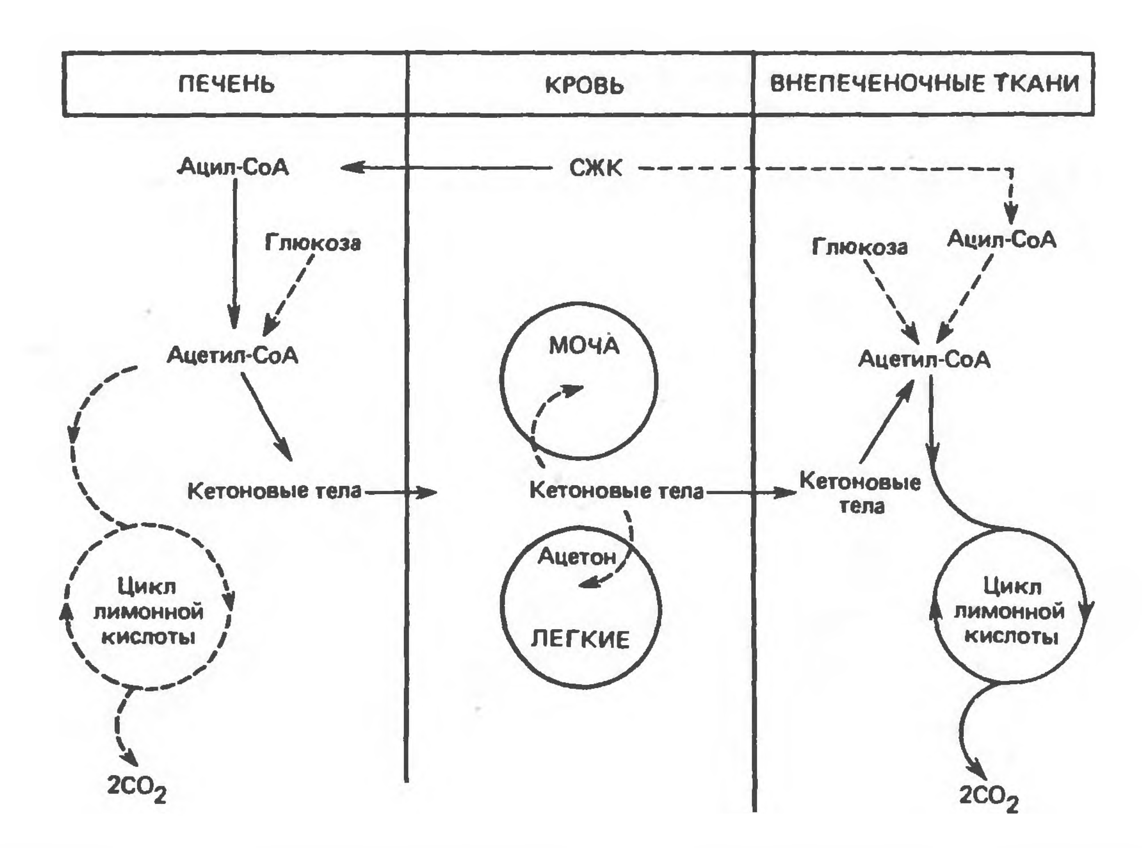


Рис. 28.3. Образование, утилизация и выведение кетоновых тел. Главный путь показан непрерывными стрелками.

ткани обусловлен функционированием в печени активного ферментативного механизма образования кетоновых тел на фоне очень низкой активности ферментов печени, участвующих в их утилизации. Противоположная ситуация наблюдается во внепеченочных тканях (рис. 28.3).

Путь кетогенеза в печени

Ферменты, ответственные за образование кетоновых тел, находятся в основном в митохондриях. Раньше считали, что при окислении молекулы жирной кислоты за счет ее четырех конечных атомов углерода образуется только одна молекула ацетоацетата. Позднее, при объяснении образования более чем одного эквивалента ацетоацетата из одной молекулы длинноцепочечной жирной кислоты, а также образования кетоновых тел из уксусной кислоты, пришли к заключению, что двухуглеродные фрагменты, образующиеся при β-окислении, конденсируются друг с другом, образуя ацетоацетат. Конденсация происходит путем обращения реакции тиолитического расщепления, в результате 2 молекулы ацетил-CoA образуют ацетоацетил-CoA. Таким образом, ацетоацетил-CoA, являющийся исходным соединением при кетогенезе, образуется либо непосредственно в ходе β-окисления, либо в результате конденсации ацетил-CoA (рис. 28.4). Предложены два пути образования ацетоацетата из ацетил-CoA. Первый—обычное деацилирование, второй (рис. 28.5)—конденсация молекулы ацетоацетил-CoA с молекулой ацетил-CoA с образованием 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA (ГМГ-CoA), катализируемая **3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-синтазой.** Под действием другого фермента, локализованного в митохондриях, **3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-лиазы,** ацетил-CoA отщепляется от ГМГ-CoA, и образуется свободный ацетоацетат. Атомы углерода отщепившейся молекулы ацетил-CoA исходно принадлежали молекуле ацетоацетил-CoA (рис. 28.5). **Для осуществления кетогенеза необходимо, чтобы в митохондриях находились оба фермента** (такое сочетание ферментов имеется только в печени и эпителии рубца).

В настоящее время доминирует представление, согласно которому образование кетоновых тел происходит главным образом по ГМГ-CoA-пути. Хотя при голодании наблюдается значительная активация ГМГ-CoA-лиазы, имеющиеся данные не свидетельствуют о том, что этот фермент лимитирует скорость кетогенеза.

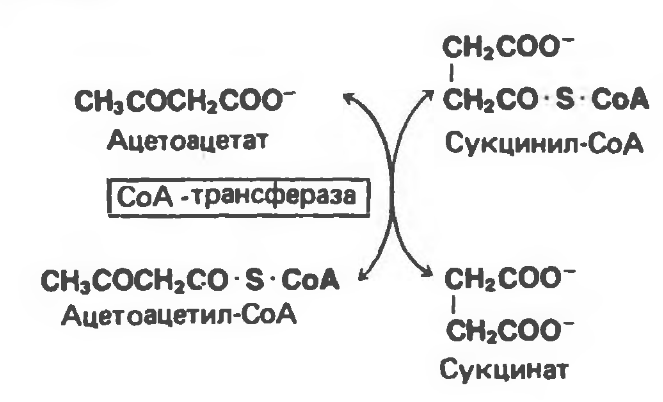
Ацетоацетат может превращаться в D(—)-3-гидроксибутират под действием D(—)-3-гидроксибутиратденидрогеназы, находящейся во многих тканях, в том числе в печени. В количественном отношении D(—)-3-гидроксибутират является при кетозе доминирующим кетоновым телом в крови и моче.

Утилизация кетоновых тел во внепеченочных тканях

В печени функционирует активный механизм образования ацетоацетата из ацетоацетил-CoA. Активация образовавшегося ацетоацетата может про-

изойти только в цитозоле, где он является предшественником при синтезе холестерола, однако активность этого пути сравнительно невелика; в результате в печени происходит образование избытка кетоновых тел.

Во внепеченочных тканях протекают две реакции, в результате которых ацетоацетат активируется в ацетоацетил-CoA. Одна из них протекает с участием сукцинил-CoA и катализируется **сукцинил-CoA-ацетоацетат-CoA-трансферазой.** Ацетоацетат реагирует с сукцинил-CoA, при этом CoA переносится на ацетоацетат и образуются ацетоацетил-CoA и сукцинат.



Другая реакция осуществляется путем активирования ацетоацетата ATP в присутствии CoA, она катализируется ацетоацетил-CoA-синтетазой.

$$\underset{\text{Ацетоацетат}}{CH_3COCH_2COO^-} + ATP + CoA\cdot SH \xrightarrow{\text{АЦЕТОАЦЕТИЛ-CoA-СИНТЕТАЗА}} \underset{\text{Ацетоацетил-CoA}}{CH_3COOH_2CO\cdot S\cdot CoA} + AMP + PP_i$$

D(−)-3-Гидроксибутират может активироваться синтетазой во внепеченочных тканях; однако доминирующим путем является превращение в ацетоацетат, катализируемое D(−)-3-гидроксибутиратдегидрогеназой при участии NAD^+, и последующее активирование с образованием ацетоацетил-CoA. Ацетоацетил-CoA, образовавшийся в результате этих реакций, расщепляется при участии тиолазы до ацетил-CoA; последний окисляется в цикле лимонной кислоты (рис. 28.4).

Кетоновые тела окисляются во внепеченочных тканях пропорционально их содержанию в крови; они подвергаются окислению предпочтительно по

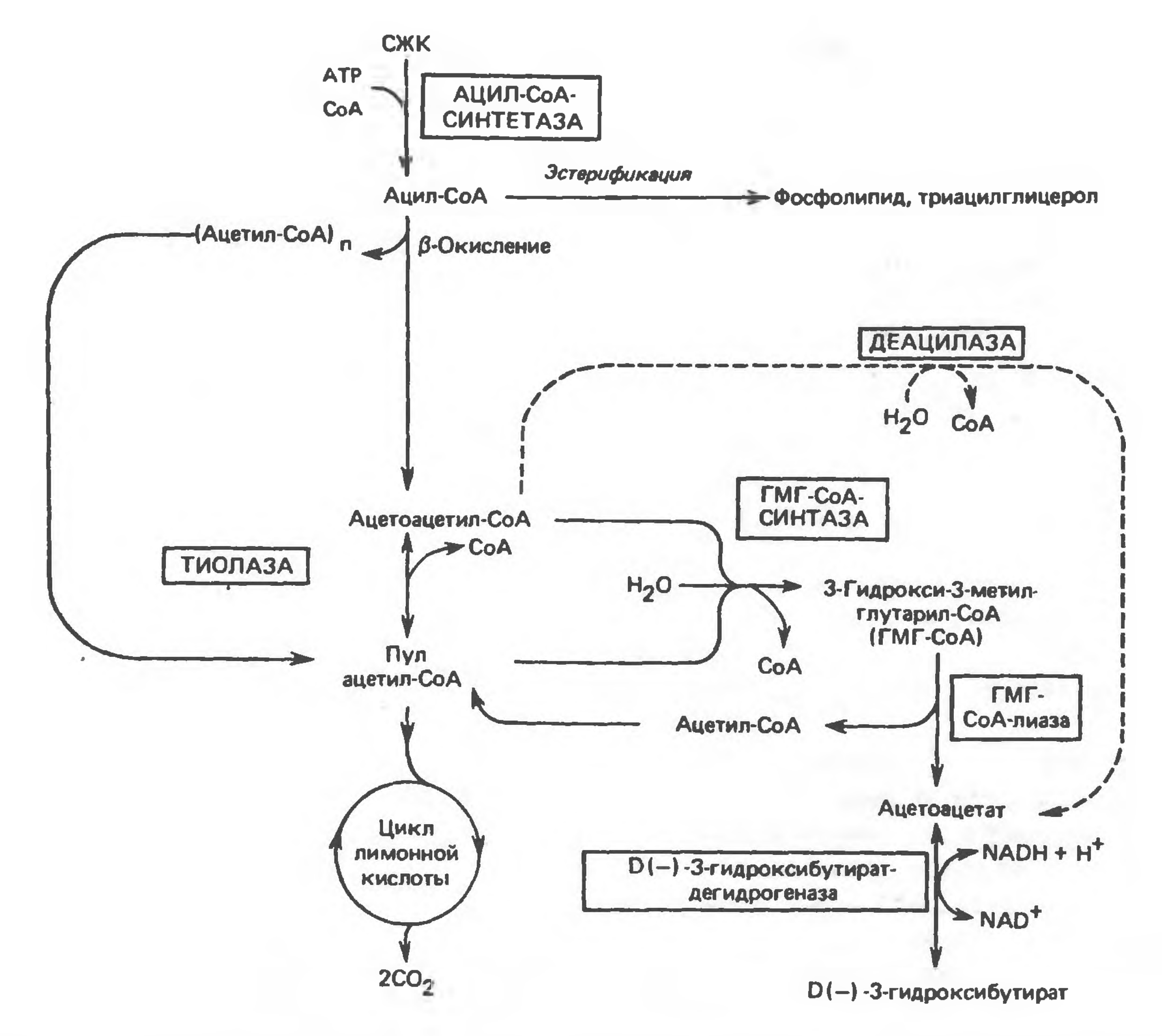


Рис. 28.4. Путь кетогенеза в печени. СЖК — свободные жирные кислоты; ГМГ — 3-гидрокси-3-метилглутарил.

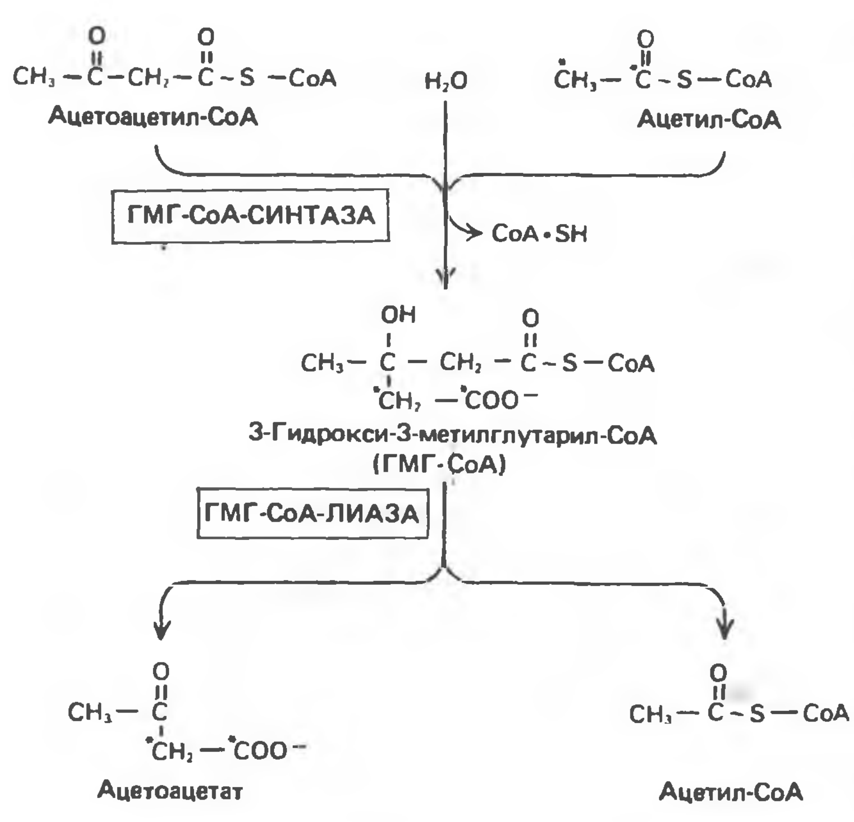


Рис. 28.5. Образование ацетоацетата из ацетоацетил-CoA (на промежуточной стадии образуется ГМГ-CoA).

Регуляция кетогенеза

Выделяют три стадии, на которых соответствующие факторы могут осуществлять регуляцию кетогенеза. (1) Кетоз не возникает in vivo до тех пор, пока не происходит увеличения уровня свободных жирных кислот в крови, образующихся в результате липолиза триацилглицерола в жировой ткани. Жирные кислоты являются предшественниками кетоновых тел в печени. Как у сытых, так и у голодных животных печень обладает способностью поглощать до 30% и более свободных жирных кислот, проходящих через нее, поэтому при высоких концентрациях этих кислот поглощение их довольно значительно. Следовательно, для регуляции кетогенеза важны факторы, контролирующие стадию мобилизации свободных жирных кислот из жировой ткани (рис. 28.6). (2) Возможны два пути превращения свободных жирных кислот после их поступления в печень и перехода в активные ацил-CoA-производные, а именно **этерификация** с образованием преимущественно триацилглицеролов и фосфолипидов и **β-окисление** до ацетил-CoA. (3) В свою очередь ацетил-CoA может либо окисляться в цикле лимонной кислоты, либо вступать на путь кетогенеза, образуя кетоновые тела.

сравнению с глюкозой и СЖК. При повышении содержания кетоновых тел в крови их окисление усиливается до тех пор, пока при концентрации 70 мг/100 мл они не насыщают окислительный механизм. В этом состоянии, по-видимому, большая часть кислорода, потребляемого животными, расходуется на окисление кетоновых тел.

Большинство данных свидетельствует о том, что **причиной кетонемии является увеличение образования кетоновых тел** в печени, а не недостаточная их утилизация во внепеченочных тканях. В то же время результаты экспериментов с крысами, у которых была удалена поджелудочная железа, показывают, что при тяжелой форме диабета кетоз может усиливаться в результате пониженной способности организма к катаболизму кетоновых тел. При умеренной кетонемии с мочой выводится только несколько процентов от общего количества образующихся кетоновых тел.

Поскольку при экскреции кетоновых тел почками наблюдаются порогоподобные эффекты (не являющиеся, однако, истинными пороговыми эффектами), которые варьируют у видов и отдельных особей, о тяжести кетогенеза следует судить по уровню кетоновых тел в крови, а не в моче.

Ацетоацетат и D(−)-3-гидроксибутират легко окисляются во внепеченочных тканях, а окисление ацетона in vivo затруднено.

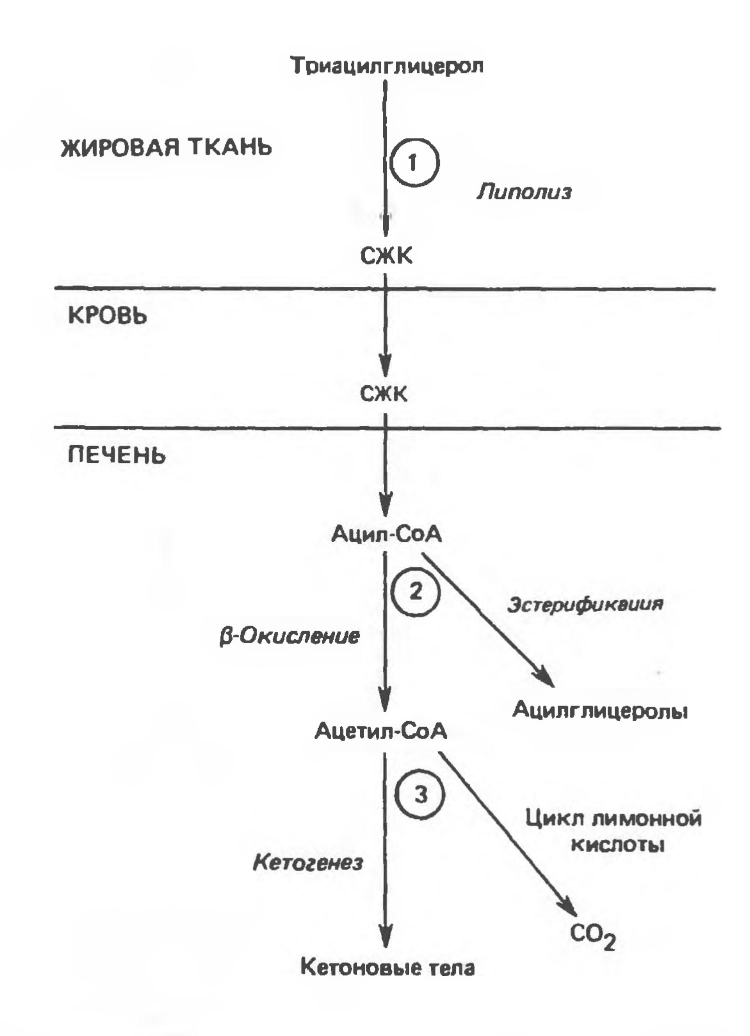


Рис. 28.6. Регуляция кетогенеза. 1—3 — три ключевые стадии на пути метаболизма свободных жирных кислот (СЖК), которые определяют количество образующихся кетоновых тел.

Одним из возможных антикетогенных факторов регуляции является эстерификация свободных жирных кислот, которая зависит от наличия в печени предшественников, обеспечивающих образование достаточного количества глицерол-3-фосфата. Однако в опытах с перфузируемой печенью, взятой у голодного животного, доступность глицерол-3-фосфата не лимитировала эстерификацию. Не вполне ясно, всегда ли доступность глицерол-3-фосфата в печени лимитирует скорость эстерификации; не имеется также убедительных данных о том, что in vivo скорость эстерификации лимитирует активность соответствующих ферментов. Вряд ли это имеет место, поскольку в печени не накапливаются ни свободные жирные кислоты, ни промежуточные продукты их эстерификации на пути образования триацилглицерола (рис. 25.1). Активность фосфатидатфосфогидролазы в печени возрастает в условиях избыточного синтеза триацилглицеролов.

В опытах с перфузируемой печенью было показано, что в печени сытых крыс эстерифицируется значительно большее количество ^{14}C-свободных жирных кислот, чем в печени голодных животных, у последних соответствующая часть неэстерифицированных жирных кислот окисляется до $^{14}CO_2$ или ^{14}C-кетоновых тел. Эти результаты можно объяснить тем, что поступление длинноцепочечных ацильных групп внутрь митохондрий, где происходит β-окисление, регулируется **карнитин-пальмитоилтрансферазой I**, локализованной в митохондриальной мембране (рис. 23.1); данный фермент малоактивен у сытых животных, у которых окисление жирных кислот заторможено, и весьма активен при голодании, которое сопровождается усиленным окислением жирных кислот. Макгарри и Фостер (McGarry, Foster, 1980) показали, что **малонил-СоА** — исходный интермедиат в синтезе жирных кислот (см. рис. 23.5) (его концентрация увеличивается в сытом состоянии) ингибирует карнитин-пальмитоилтрансферазу и выключает β-окисление. Таким образом, в сытом состоянии происходит активный липогенез и достигается высокая концентрация малонил-СоА, ингибирующего карнитин-пальмитоилтрансферазу I (рис. 28.7). Если концентрация свободных жирных кислот в клетках печени невелика, они почти полностью превращаются путем эстерификации в ацилглицеролы и выводятся из печени в составе ЛПОНП. Однако в начале голодания, когда концентрация свободных жирных кислот возрастает, ацетил-СоА-карбоксилаза ингибируется, а концентрация малонил-СоА уменьшается, ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы прекращается и создаются условия для усиленного окисления ацил-СоА. Эти процессы усиливаются при голодании в результате уменьшения отношения [инсулин]/[глюкагон], что вызывает ускорение липолиза и высвобождение свободных жирных кислот в жировой ткани и ингибирование ацетил-СоА-карбоксилазы в печени.

При повышении уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови пропорционально больше свободных жирных кислот превращается в кетоновые тела и соответственно меньше окисляется в цикле лимонной кислоты до CO_2. При этом в результате регулирования достигается такое распределение ацетил-СоА между путем кетогенеза и путем окисления до CO_2, что свободная энергия, запасаемая в форме АТР в процессе окисления свободных жирных кислот, остается постоянной. При полном окислении 1 моля пальмитата путем β-окисления и последующего образования CO_2 в цикле лимонной кислоты генерируется 129 молей АТР (см. гл. 23); **если же конечным продуктом является ацетоацетат, образуется всего 33 моля АТР, а если 3-гидроксибутират — то только 21 моль.** Следовательно, кетогенез можно рассматривать как механизм, позволяющий печени окислять большие количества жирных кислот, используя реакции, входящие в систему окислительного фосфорилирования (при этом генерация макроэргов невелика).

Предложен ряд других гипотез по поводу переключения пути окисления жирных кислот в направлении кетогенеза. Теоретически снижение концентрации оксалоацетата в митохондриях должно понижать возможность метаболизма ацетил-СоА в цикле лимонной кислоты. Причиной уменьшения концентрации оксалоацетата может являться увеличение отношения [NADH]/[NAD$^+$] при усиленном β-окислении. Кребс предположил, что, поскольку оксалоацетат находится также на главном пути глюконеогенеза, усиление этого процесса, ведущее к снижению уровня оксалоацетата, может являться причиной тяжелых форм кетоза, в частности при диабете и кетозе крупного рогатого скота. Уттер и Кич (Utter, Keech) показали, что пируваткарбоксилаза, катализирующая превращение пирувата в оксалоацетат, активируется ацетил-СоА. Следовательно, при значительном количестве ацетил-СоА необходимо достаточное для запуска реакции конденсации в цикле лимонной кислоты количество оксалоацетата.

В заключение суммируем, что кетоз возникает в результате недостатка доступных углеводов, это обстоятельство следующим образом способствует кетогенезу (рис. 28.6 и 28.7). (1) Оно приводит к дисбалансу между эстерификацией и липолизом в жировой ткани, в результате которого свободные жирные кислоты поступают в кровоток. Эти кислоты являются главным субстратом для образования кетоновых тел в печени; поэтому все факторы как метаболические, так и эндокринные, влияющие на высвобождение свободных жирных кислот из жировой ткани, воздействуют также на процесс кетогенеза. (2) После поступления свободных жирных кислот в печень рас-

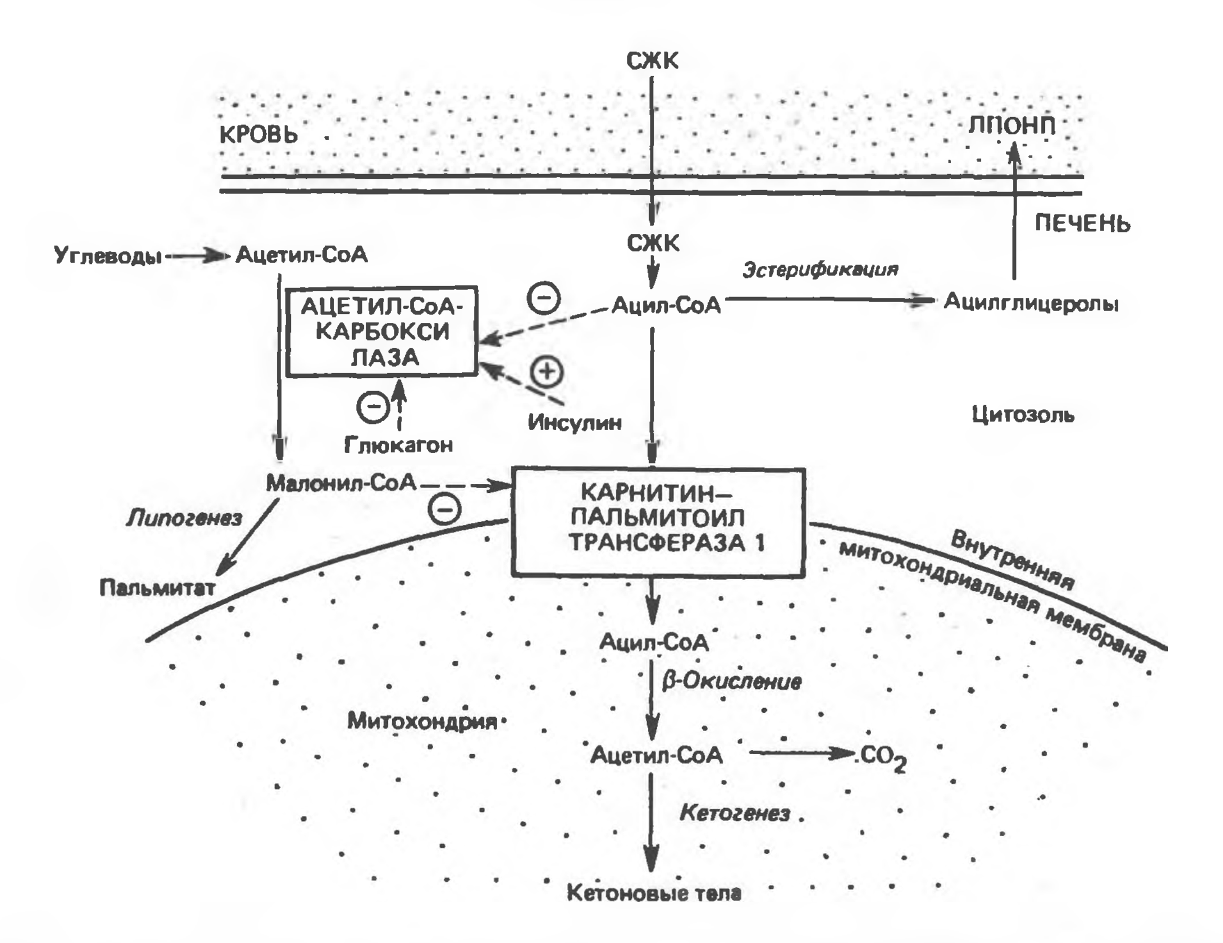


Рис. 28.7. Регуляция окисления длинноцепочечных жирных кислот в печени. СЖК—свободные жирные кислоты, ЛПОНП—липопротеины очень низкой плотности. Пунктирными линиями показаны положительные (⊕) и отрицательные (⊖) регуляторные эффекты, а сплошными линиями—поток субстрата.

пределение их по путям эстерификации и окисления регулируется карнитин-пальмитоилтрансферазой I, активность которой зависит (опосредованно) от концентрации свободных жирных кислот и гормонального статуса печени. (3) При увеличении количества окисляемых жирных кислот возрастает доля образуемых кетоновых тел и соответственно уменьшается доля субстрата, который подвергается катаболизму до CO_2; при этом в результате регуляции общий выход АТР остается постоянным.

Кетоз in vivo

Наблюдаемый при голодании и при потреблении жирной пищи кетоз протекает в относительно легкой форме по сравнению с кетозом, развивающимся при неконтролируемом диабете, токсикозе беременности у овец или у крупного рогатого скота в период лактации. Основная причина этого, по-видимому, заключается в том, что при указанных заболеваниях количество доступных для тканей углеводов существенно меньше, чем при голодании и потреблении жирной пищи. Так, при умеренном диабете, приеме жирной пищи и хроническом голодании в печени сохраняется гликоген (количество его варьирует); менее выражено снижение уровня свободных жирных кислот. Этим, вероятно, можно объяснить менее тяжелую форму кетоза, которая наблюдается в этих случаях. У жвачных кетоз протекает на фоне значительного снижения содержания глюкозы в крови, что связано с обеспечением потребностей плода или молочных желез при интенсивной лактации (рис. 28.8). В результате у жвачных может развиться острая гипогликемия, при которой в печени практически не остается гликогена. В этих условиях кетоз протекает в тяжелой форме. По мере развития гипогликемии уменьшается секреция инсулина, в результате не только снижается утилизация глюкозы, но и усиливается липолиз в жировой ткани.

При сахарном диабете недостаток или отсутствие инсулина влияют, вероятно, в первую очередь на метаболизм в жировой ткани, крайне чувствительной к этому гормону. В результате высвобождения большого количества свободных жирных кислот их уровень в плазме крови может оказаться в два с лишним раза выше, чем у здорового голодного человека. Наблюдается также изменение активности ряда ферментов в печени, в результате увеличивается скорость глюконеогенеза и скорость поступления глюкозы в кровь (несмотря на высокую концентрацию глюкозы в крови).

ВЗАИМНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ ОСНОВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ (рис. 28.9)

Тот факт, что животные могут накапливать жир, питаясь исключительно углеводами, свидетель-

ствует о легкости перехода углеводов в жиры. Наиболее важной реакцией в этом процессе является превращение пирувата в ацетил-СоА, который служит исходным соединением при синтезе длинноцепочечных жирных кислот. Поскольку, однако, **реакция, катализируемая пируватдегидрогеназой, является необратимой**, то прямое превращение ацетил-СоА, образовавшегося при окислении жирных кислот, в пируват оказывается невозможным. В цикле лимонной кислоты не происходит новообразования оксалоацетата, поскольку ацетил-СоА конденсируется с молекулой оксалоацетата и в результате цикла одна молекула оксалоацетата регенерируется. По этой же причине **не происходит превращения жирных кислот с четным числом углеродных атомов** (образующих при окислении только ацетил-СоА) **в глюкозу и гликоген.**

Только концевой трехуглеродный фрагмент молекулы жирной кислоты с нечетным числом атомов углерода является потенциальным субстратом для образования гликогена, поскольку только из этой части молекулы при окислении образуется пропионат. Тем не менее меченые углеродные атомы жирных кислот после прохождения через цикл лимонной

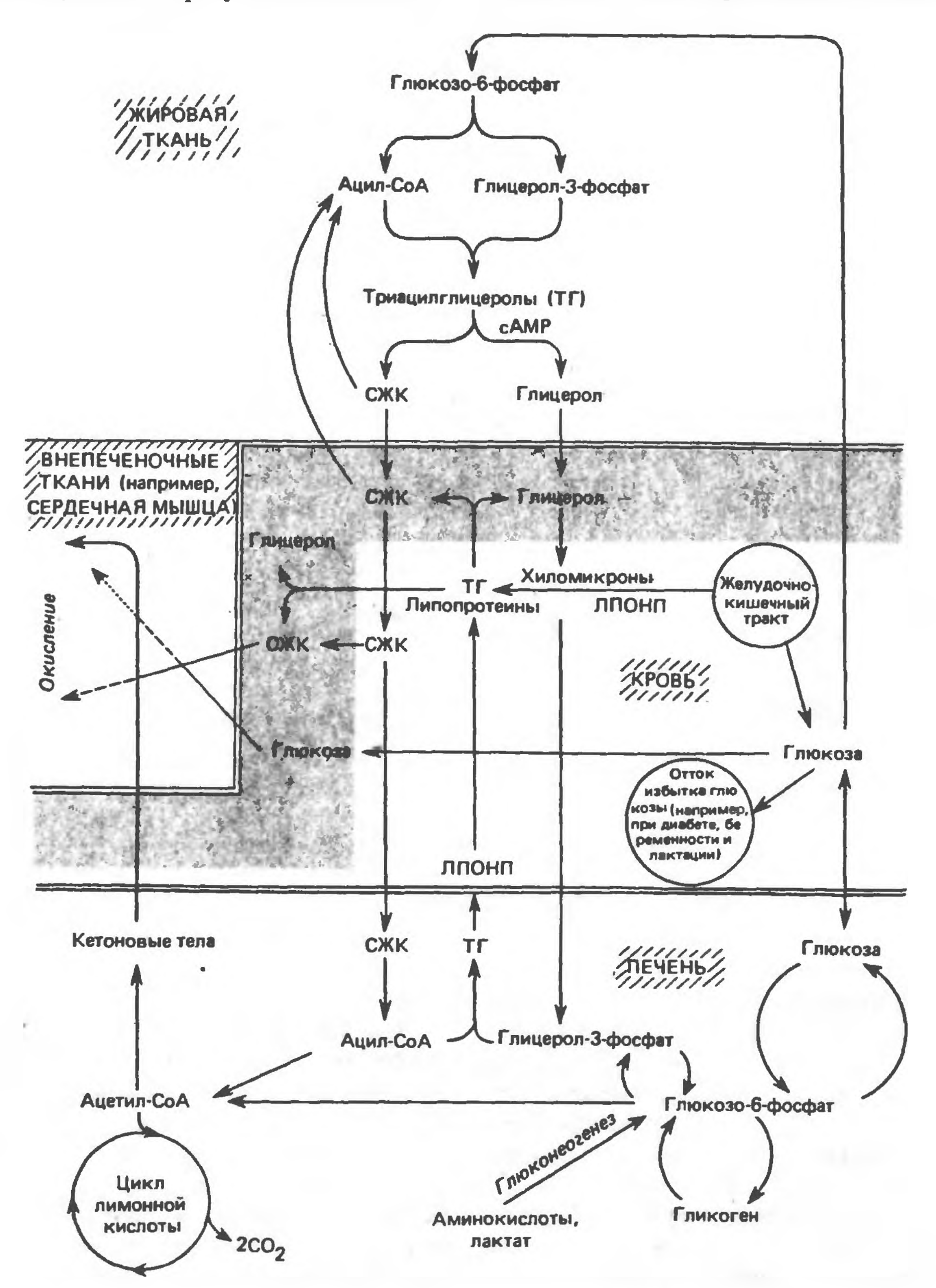


Рис. 28.8. Взаимосвязь метаболических процессов, протекающих в жировой ткани, печени и внепеченочных тканях. Заштрихованные участки — локализация липопротеинкиназы в стенках капиллярных сосудов; СЖК — свободные жирные кислоты; ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности.

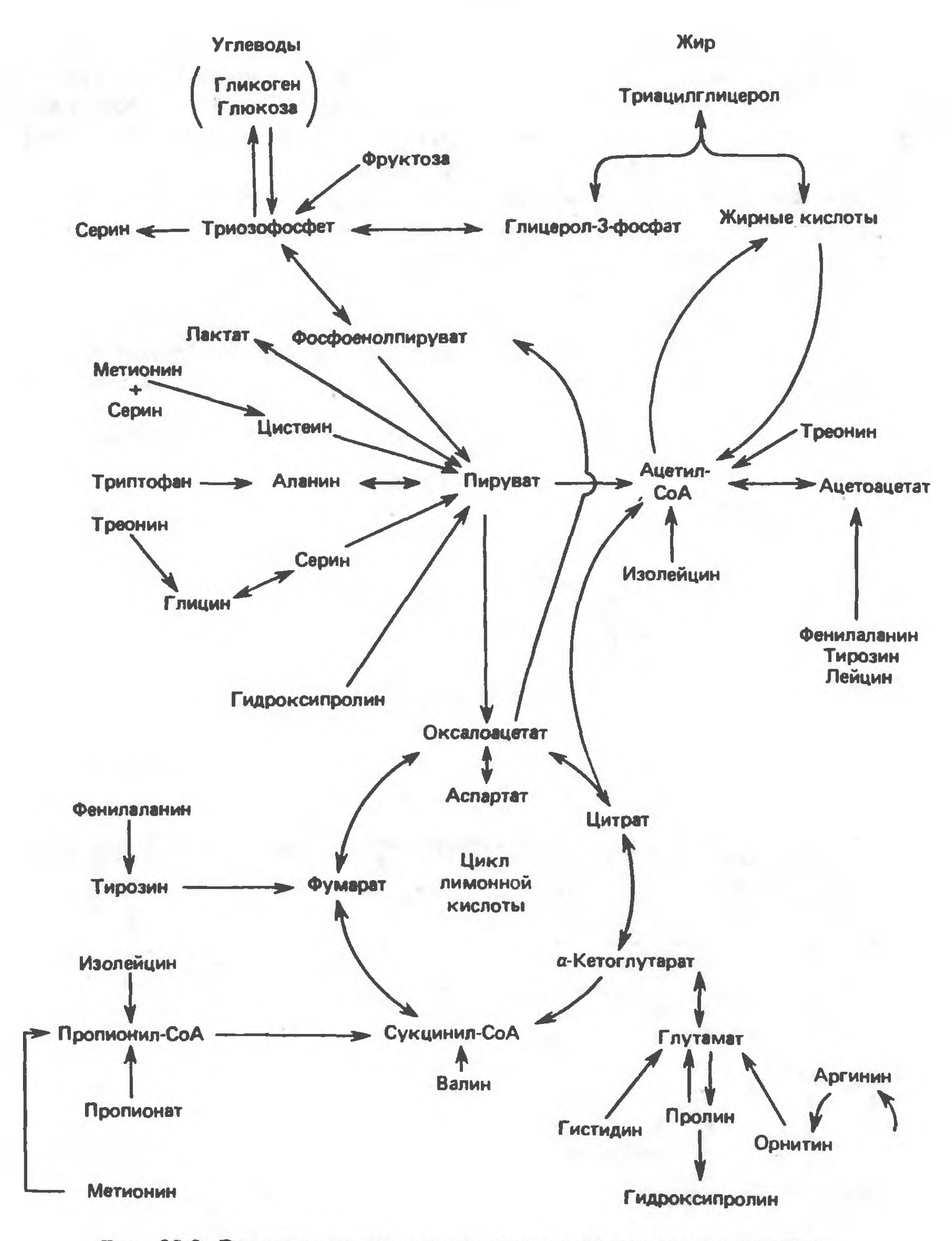


Рис. 28.9. Взаимопревращение основных питательных веществ.

кислоты могут быть обнаружены в гликогене. Это объясняется тем, что оксалоацетат является промежуточным продуктом как в цикле лимонной кислоты, так и в глюконеогенезе. Углеродные скелеты ряда заменимых аминокислот могут образовываться из углеводов на стадиях цикла лимонной кислоты. В результате обращения процессов гликогенные аминокислоты в свою очередь могут явиться источником образования углеродных скелетов соединений, являющихся интермедиатами цикла лимонной кислоты или их предшественниками. Эти аминокислоты, следовательно, легко превращаются по пути глюконеогенеза в глюкозу и гликоген. Кетогенные аминокислоты служат источником ацетоацетата, из которого во внепеченочных тканях образуется ацетил-CoA.

По тем же (рассмотренным выше) причинам, по которым прямое превращение жирных кислот в углеводы оказывается невозможным, исключается также возможность превращения жирных кислот в глюкогенные аминокислоты. Невозможно также обращение пути распада кетогенных аминокислот. Все они относятся к категории «незаменимых» аминокислот. Превращение углеродных скелетов глюкогенных аминокислот в жирные кислоты возможно либо путем образования пирувата и ацетил-CoA, либо путем обращения внемитохондриальных реакций цикла лимонной кислоты на участке от α-

кетоглутарата к цитрату с последующим образованием ацетил-СоА при участии АТР-цитрат-лиазы (см. гл. 23). Однако деградация белков и аминокислот в естественных условиях, например, при голодании, обычно сопровождается расщеплением жиров. Превращение аминокислот в жир не имеет, следовательно, существенного значения, за исключением случаев, когда животные получают богатую белками пищу.

ЭКОНОМИКА УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ОРГАНИЗМЕ

Потребность в глюкозе

Известны многие детали взаимодействия углеводного и липидного обмена в различных тканях. В условиях оптимального питания легко протекает процесс превращения глюкозы в жир. Жир (триацилглицерол), за исключением глицерольного фрагмента, не может превращаться в глюкозу (см. выше). Некоторые ткани и клетки, в первую очередь клетки центральной нервной системы и эритроциты, в значительно большей степени, чем другие, нуждаются в постоянном поступлении глюкозы. Минимальное количество глюкозы, вероятно, необходимо также клеткам внепеченочных тканей для функционирования цикла лимонной кислоты. Кроме того, глюкоза является, по-видимому, главным источником глицерол-3-фосфата в тканях, не имеющих глицеролкиназы. Для функционирования клеток необходим определенный (минимальный) уровень окисления глюкозы. Большое количество глюкозы требуется для питания плода и образования молока. Ряд механизмов наряду с глюконеогенезом гарантирует необходимое обеспечение глюкозой в период ее недостатка; при этом важное значение имеет экономия глюкозы за счет других субстратов.

Предпочтительная утилизация кетоновых тел и свободных жирных кислот

Кетоновые тела и свободные жирные кислоты экономят глюкозу в мышцах; они тормозят (опосредованно) ее поступление в клетки, ее фосфорилирование с образованием глюкозо-6-фосфата, а также активность фосфофруктокиназы и окислительное декарбоксилирование пирувата. Окисление свободных жирных кислот и кетоновых тел приводит к повышению внутриклеточной концентрации цитрата, который ингибирует фосфофруктокиназу. Эти данные, а также результаты экспериментов с перфузируемым сердцем, которые показали, что ацетоацетат окисляется предпочтительно по сравнению с жирными кислотами, согласуются с заключением о том, что при ограниченной доступности углеводов потенциальные **источники энергии окисляются в следующем порядке**: (1) **кетоновые тела** (и, возможно, другие короткоцепочечные жирные кислоты, например ацетат), (2) **свободные жирные кислоты**, (3) **глюкоза**. Это отнюдь не значит, что при окислении одного из источников энергии полностью прекращается окисление других источников (рис. 28.8). Механизмы, которые упорядочивают последовательность использования источников энергии, приобретают особое значение в тканях, обладающих высокой способностью к аэробному окислению жирных кислот (например, в сердце и медленно сокращающихся мышцах), и играют менее значительную роль в тканях с низкой эффективностью окисления, например в быстро сокращающихся мышцах.

Сочетание эффекта экономии глюкозы в мышцах и сердце, вызываемого свободными жирными кислотами, и эффекта ингибирования мобилизации свободных жирных кислот в жировой ткани, вызываемого сэкономленной глюкозой, получило название «глюкозо-жирнокислотный цикл».

ГОЛОДАНИЕ

У животных, получающих богатую углеводами пищу, окисление жирных кислот понижается. При переходе животного от сытого состояния к голоданию количество доступной глюкозы снижается, и для поддержания уровня глюкозы в крови начинает расходываться гликоген печени. Концентрация инсулина в крови падает, а концентрация глюкагона возрастает.

В жировой ткани уменьшается утилизация глюкозы и снижается ингибирующее действие инсулина на липолиз, жир мобилизуется в виде свободных жирных кислот и глицерола. Свободные жирные кислоты переносятся в другие ткани, где они либо окисляются, либо эстерифицируются. Глицерол после активации (превращения в глицерол-3-фосфат) поступает в углеводный пул (в основном в печени и почках). Во время перехода от сытого состояния к голоданию эндогенное образование глюкозы (из аминокислот и глицерола) отстает от ее использования и окисления, запасы гликогена в печени истощаются и концентрация глюкозы в крови падает. Мобилизация жира возрастает в течение нескольких часов, затем содержание свободных жирных кислот в плазме и глюкозы в крови стабилизируется на уровне, характерном для состояния голодания (0,7—0,8 мкмоль·мл$^{-1}$ и 60—70 мг/100 мл соответственно). Можно полагать, что при этом уровне глюкозы в крови животного ее поступление в ткани обеспечивает потребности утилизации и окисления. Компенсаторное увеличение окисления жирных кислот и кетоновых тел позволяет снизить уровень окисления

глюкозы. Наступившее неустойчивое равновесие может нарушаться в результате роста потребности в глюкозе или при нарушении процессов утилизации; в таком случае происходит дальнейшая мобилизация жиров. Обеспечение организма **глицеролом** является важной функцией жировой ткани, поскольку только этот источник углеводов (наряду с углеводами, образующимися **из белков при глюконеогенезе**) может обеспечить голодающий организм глюкозой, необходимой для тех процессов, при осуществлении которых субстратом может служить только глюкоза. У человека при длительном голодании **глюконеогенез из белков** снижается из-за уменьшения высвобождения аминокислот, особенно аланина, из мышц. Это совпадает по времени с адаптацией мозга, в результате которой он оказывается способным компенсировать окисление глюкозы примерно на 50% за счет окисления кетонов.

Регуляция высвобождения свободных жирных кислот из жировой ткани при голодании по принципу обратной связи может осуществляться путем прямого воздействия кетоновых тел и свободных жирных кислот на поджелудочную железу, в результате которого возрастает образование инсулина. Мобилизация свободных жирных кислот обычно превышает потребности окислительных процессов, поскольку даже в период голодания значительная доля этих кислот подвергается эстерификации. Поскольку клетки печени поглощают и эстерифицируют значительную часть свободных жирных кислот, она выполняет регуляторную роль путем выведения избытка свободных жирных кислот из системы кровообращения. Если организм получает достаточное количество углеводов, бóльшая часть свободных жирных кислот в печени эстерифицируется и в конечном счете транспортируется из нее в составе ЛПОНП и используется в других тканях. Однако при увеличении притока свободных жирных кислот возможен и альтернативный путь — **кетогенез**, позволяющий печени продолжать ретранспортировать большую часть поглощенных ею жирных кислот в форме, удобной для усвоения их внепеченочными тканями.

Большинство рассмотренных положений отражено на рис. 28.8. Следует отметить, что функционирует углеводный цикл, включающий высвобождение глицерола из жировой ткани, его превращение в печени в глюкозу и перенос последней обратно в жировую ткань. Другой цикл, липидный, включает высвобождение свободных жирных кислот из жировой ткани, перенос их в печень, эстерификацию и возврат в жировую ткань в составе ЛПОНП.

ЛИТЕРАТУРА

Cohen P. Control of Enzyme Activity, 2nd ed. Chapman and Hall, 1983.

Heu L., Van de Werve G. (eds). Short-Term Regulation of Liver Metabolism. Elsevier/North Holland, 1981.

Laker M. E., Mayes P. A. Investigation into the direct effects of insulin on hepatic ketohenesis, lipoprotein secretion and pyruvate dehydrogenase activity, Biochim. Biophys. Acta, 1984, **795**, 4.

Mayes P. A., Laker M. E. Regulation of ketogenesis in the liver, Biochem. Soc. Trans., 1981, **9**, 339.

McGarry J. D., Foster D. W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production, Annu. Rev. Biochem., 1980, **49**, 395.

Siess E. A., Kientsch-Engel R. I., Wieland O. H. Concentration of free oxaloacetate in the mitohondrial compartment of isolated liver cells. Biochem. J. 1984, **218**, 171.

Wakil S. J., Stoops J. K., Joshi V. C. Fatty acid synthesis and its regulation, Annu. Rev. Biochem., 1983, **52**, 537.

Zorzano A. et al. Effects of starvation and exercise on concentrations of citrate, hexose phosphates and glycogen in skeletal muscle and heart: Evidence for selective operation of the glucose-fatty acid cycle, Biochem. J., 1985, **232**, 585.

Раздел III
Метаболизм белков и аминокислот

Глава 29

Биосинтез аминокислот

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Оценивая пищевую ценность аминокислот, мы часто одни из них называем «незаменимыми», а другие — «заменимыми» (табл. 29.1). Хотя с точки зрения питания все это верно, не следует упускать из виду общую биологическую значимость и незаменимость всех 20 аминокислот. Более того, можно даже заключить, что как раз «заменимые» аминокислоты более важны для клетки, чем «незаменимые», поскольку утрата способности организма (например, организма человека) синтезировать определенные аминокислоты представляется в эволюционном отношении более естественной в отношении менее важных аминокислот.

Пищевые потребности в тех или иных соединениях свидетельствуют о том, что зависимость от внешнего источника метаболитов может оказаться более благоприятной для выживания организма, чем способность организма синтезировать эти соединения. Если специфический интермедиат присутствует в пище, то организм, сохраняющий способность синтезировать это соединение, передает будущим поколениям соответствующую генетическую информацию отрицательной ценности. Это свойство для организма не просто бесполезно, но даже вредно, поскольку приходится дополнительно затрачивать питательные вещества и ATP на синтез «лишних» фрагментов ДНК. В клетках прокариот число ферментов, необходимых для синтеза незаменимых аминокислот, существенно больше числа ферментов, необходимых для синтеза заменимых аминокислот (табл. 29.2). Следовательно, сохранение возможности син-

Таблица 29.1. Потребности человека в аминокислотах

Незаменимые	Заменимые
Аргинин[1]	Аланин
Валин	Аспарагин
Гистидин[1]	Аспартат
Изолейцин	Гидроксилизин[2]
Лейцин	Гидроксипролин[2]
Лизин	Глицин
Метионин	Глутамат
Треонин	Глутамин
Триптофан	Пролин
Фенилаланин	Серин
	Тирозин
	Цистеин

[1] Фактически это «полунезаменимая» аминокислота, поскольку она синтезируется в организме, однако скорость синтеза недостаточна для того, чтобы обеспечить рост организма в детском возрасте.

[2] Не используется в процессе синтеза белка и образуется в ходе посттрансляционного процессинга коллагена.

Таблица 29.2. Ферменты, необходимые для синтеза аминокислот из амфиболических метаболитов

Число ферментов, требующихся для синтеза	
незаменимых аминокислот	заменимых аминокислот
Arg 7 (из Glu)	Ala 1
His 6	Asp 1
Thr 6	Asn 1 (из Asp)
Met 5	Glu 1
Lys 8	Gln 1 (из Glu)
Ile 8	Pro 3 (из Glu)
Val 1	Ser 3
Leu 3	Gly 1 (из Ser)
Phe 10	Cys 2 (из Ser + S^{2-})
Trp 5	Tyr 1 (из Phe)
Итого 59	Hyl 1 (из Lys)
	Hyp 1 (из Pro)
	Итого 17

тезировать «легкие» аминокислоты и утрата способности к синтезу «трудных» имеют определенные биологические преимущества.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Медицинская значимость материала этой главы обусловлена серьезными последствиями дефицита незаменимых аминокислот, возникающего из-за их отсутствия в составе пищи или присутствия в недостаточных количествах. Некоторые злаки относительно бедны триптофаном и лизином, и в тех районах, где основным источником пищевого белка служат именно эти растения, а другие источники белка (молоко, рыба или мясо) в пище отсутствуют, у населения часто наблюдаются случаи тяжелой недостаточности аминокислот. В ряде районов Западной Африки широко распространены детская дистрофия (квашиоркор) и кахексия. Квашиоркор развивается в тех случаях, когда ребенок после отнятия от груди переводится на обедненную белком крахмальную диету. Кахексия является следствием малокалорийной диеты, обедненной специфическими аминокислотами.

БИОСИНТЕЗ ЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ

Из 12 заменимых аминокислот (табл. 29.1) 9 образуются из амфиболических метаболитов, а три (Cys, Tyr и Hyl) — из незаменимых аминокислот.

Центральное место в биосинтезе аминокислот занимают глутаматдегидрогеназа, глутаминсинтаза и трансаминазы. Благодаря совместному действию этих ферментов катализируется включение неорганического иона аммония в α-аминогруппу аминокислот.

Глутамат

Восстановительное аминирование α-кетоглутарата катализируется глутаматдегидрогеназой (рис. 29.1). Помимо того что эта реакция приводит к образованию L-глутамата из амфиболического метаболита, α-кетоглутарата, она является ключевой стадией биосинтеза многих других аминокислот.

Глутамин

Биосинтез глутамина из глутамата катализируется глутаминсинтетазой (рис. 29.2). Данная реакция имеет как сходство с реакцией, катализируемой глу-

α-Кетоглутарат
L-Глутамат
NH_4^+
H_2O
NAH(P)H + H^+
$NAD(P)^+$

Рис. 29.1. Реакция, катализируемая глутаматдегидрогеназой. Восстановительное аминирование α-кетоглутарата ионами NH_4^+ происходит за счет NAD(P)H.

L-Глутамат
L-Глутамин
NH_4^+
Mg-ATP
Mg-ADP + P_i

Рис. 29.2. Реакция, катализируемая глутаминсинтетазой.

Рис. 29.3. Образование аланина путем переаминирования пирувата. Донором аминогруппы может быть глутамат или аспартат. Другим продуктом реакции служит α-кетоглутарат или оксалоацетат.

таматдегидрогеназой, так и отличия от нее. В обоих случаях «фиксируется» неорганический азот, который в одном случае включается в аминогруппу, а в другом — в амидную группу. Обе реакции сопряжены с сильно экзергоническими реакциями: в случае глутаматдегидрогеназы с окислением NAD(P)H, а в случае глутаминсинтетазы с гидролизом ATP.

Аланин и аспартат

L-аланин образуется из пирувата путем переаминирования с глутаматом, а L-аспартат — тем же путем из оксалоацетата (рис. 29.3). Перенос α-аминогруппы глутамата на амфиболические метаболиты иллюстрирует участие трансаминаз в процессах включения иона аммония в α-аминогруппы аминокислот.

Аспарагин

Образование аспарагина из аспартата, катализируемое аспарагинсинтетазой (рис. 29.4), сходно с синтезом глутамина (рис. 29.2). Аспарагинсинтетаза млекопитающих в качестве источника азота использует не ион аммония, а глутамин и, следовательно, не «фиксирует» неорганического азота. Бактериальные же аспарагинсинтетазы используют ион аммония, следовательно, «фиксируют» неорганический азот. Как и в случае других реакций, сопровождающихся образованием PP_i, последующий гидролиз PP_i до P_i с участием пирофосфатазы обеспечивает энергетически благоприятные условия для протекания реакции.

Серин

Серин образуется из гликолитического промежуточного продукта D-3-фосфоглицерата (рис. 29.5). α-гидроксильная группа при участии NAD^+ окисляется в оксогруппу; далее в результате переаминирования образуется фосфосерин, который затем дефосфорилируется, образуя серин.

Глицин

Синтез глицина в тканях млекопитающих осуществляется несколькими путями. В цитозоле печени содержится глицинтрансаминаза, катализирующая синтез глицина из глиоксилата и глутамата (или аланина). В отличие от большинства реакций переаминирования равновесие этой реакций сильно смещено в направлении синтеза глицина. Два важных дополнительных пути, функционирующие у млекопитающих, используют для образования глицина холин (рис. 29.6) и серин; в последнем случае катализ осуществляется серингидроксиметилтрансферазой (рис. 29.7).

Пролин

У млекопитающих и некоторых других организмов пролин образуется из глутамата путем обращения реакций катаболизма пролина (рис. 29.8).

Гидроксипролин

Поскольку пролин служит предшественником гидроксипролина, то обе аминокислоты рассматривают как принадлежащие к глутаматному семейству аминокислот. Хотя в тканях млекопитающих встречаются как 3-, так и 4-гидроксипролин, в последующем изложении речь будет идти исключительно о *транс*-4-гидроксипролине.

Рис. 29.4. Реакция, катализируемая аспарагинсинтетазой. Обратите внимание на сходство и различия с реакцией, катализируемой глутаминсинтетазой (рис. 29.2). Природа донора аминогруппы ($R—NH_3^+$) может различаться у разных организмов.

D-3-Фосфоглицерат

NAD^+ → $NADH + H^+$

Фосфогидроксипируват

α-АК → α-КК

Фосфо-L-серин

H_2O → P_i

L-Серин

Рис. 29.5. Биосинтез серина. α-**АК** — α-аминокислота, α-**КК** — α-кетокислота.

Гидроксипролин, как и гидроксилизин, содержится в тканях практически только в составе коллагена, на долю которого приходится бóльшая часть белка в организме млекопитающих. В коллагене одна треть аминокислотных остатков приходится на глицин и еще одна треть на пролин и гидроксипролин. Гидроксипролин, представленный в коллагене весьма большим числом остатков, стабилизирует тройную спираль коллагена по отношению к действию протеаз. В отличие от гидроксилизина, гидроксильная группа которого служит местом присоединения остатков галактозы и глюкозы, гидроксильные группы гидроксипролина в коллагене остаются незамещенными.

Уникальной особенностью метаболизма гидроксипролина и гидроксилизина является то обстоятельство, что эти аминокислоты, входящие в состав

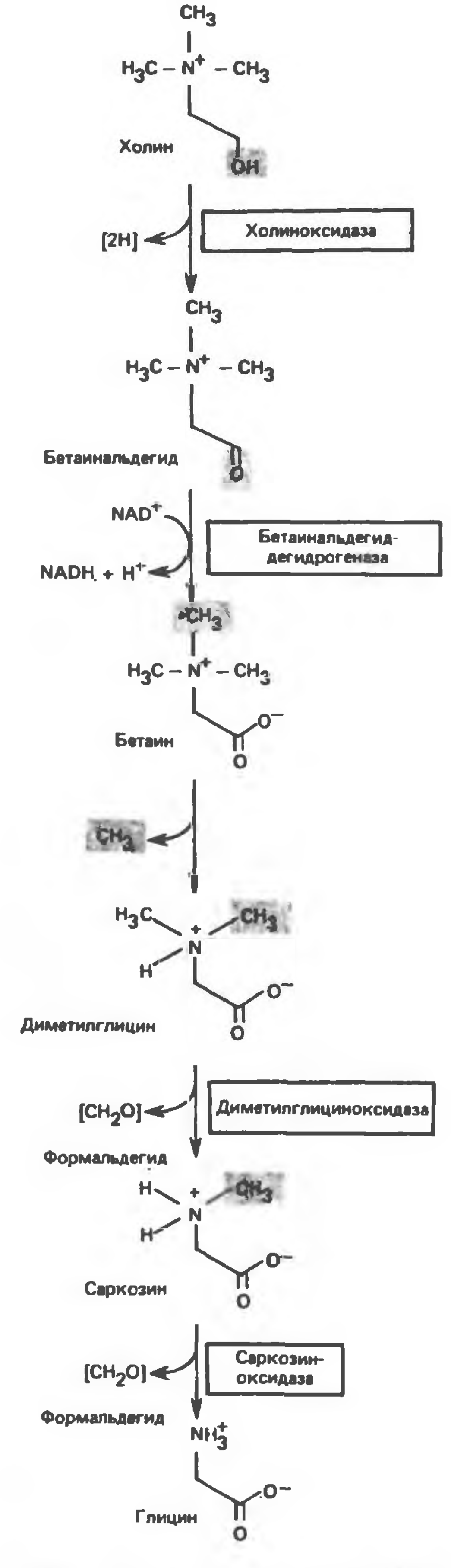


Рис. 29.6. Образование глицина из холина.

Рис. 29.7. Реакция, катализируемая сeрингидроксиметилтрансферазой. Реакция легко обратима. H_4 фолат — тетрагидрофолат.

белков пищи, не включаются в коллаген. Не существует тРНК, которая могла бы акцептировать гидроксипролин или гидроксилизин и далее включать их в растущую полипептидную цепь. В то же время пищевой пролин является предшественником гидроксипролина, а пищевой лизин — предшественником гидроксилизина в составе коллагена. Гидроксилирование пролина (или лизина) катализируется пролилгидроксилазой (или лизилгидроксилазой) — ферментами, находящимися в микросомальной фракции многих тканей (кожи, печени, легких, сердца, скелетной мышцы, гранулирующих раневых поверхностей). Эти ферменты являются пептидилгидроксилазами, поскольку гидроксилирование происходит только после включения пролина или лизина в полипептидную цепь (см. гл. 55).

Рис. 29.8. Биосинтез пролина из глутамата путем обращения реакций катаболизма пролина.

Обе гидроксилазы являются оксигеназами со смешанной функцией и функционируют при участии молекулярного кислорода, аскорбата, ионов Fe^{+2} и α-кетоглутарата. Пролилгидроксилаза изучена более подробно; есть основания полагать, что лизилгидроксилаза действует аналогичным образом. На каждый моль гидроксилированного пролина декарбоксилируется 1 моль α-кетоглутарата с образованием сукцината. В ходе этого процесса один атом кислорода молекулы O_2 включается в состав пролина, а другой — в сукцинат (рис. 29.9).

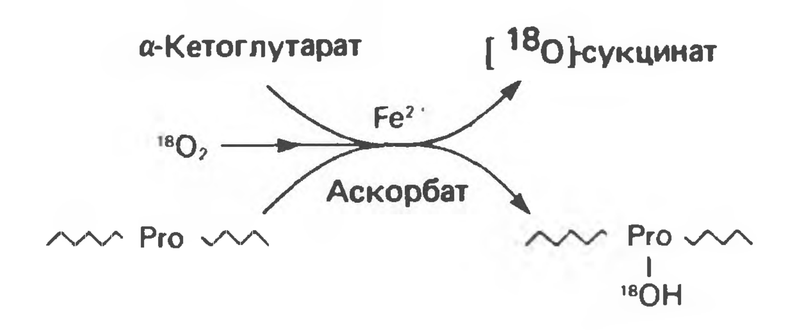


Рис. 29.9. Реакция, катализируемая пролил-гидроксилазой. Субстратом служит богатый пролином пептид. В результате реакции один атом молекулярного кислорода поступает в сукцинат, а другой — в пролин (установлено с использованием $^{18}O_2$).

Цистеин

Цистеин, не относящийся к незаменимым аминокислотам, образуется из незаменимого метионина и заменимого серина. Сначала происходит превращение метионина в гомоцистеин с образованием на промежуточных стадиях S-аденозилметионина и S-аденозилгомоцистеина (см. гл. 31). Превращение гомоцистеина и серина в цистеин и гомосерин показано на рис. 29.10.

Тирозин

Тирозин образуется из фенилаланина в реакции, катализируемой фенилаланингидроксилазой (рис. 29.11), поэтому фенилаланин относится к незаменимым аминокислотам, а тирозин — нет (при условии, что диета содержит достаточное количество фенилаланина). Реакция необратима, и поэтому тирозин не может заменить пищевой фенилаланин. **Фенилаланингидроксилазный комплекс** является оксигеназой со смешанной функцией, она имеется в печени млекопитающих и отсутствует в других тканях. В резу-

Рис. 29.10. Превращение гомоцистеина и серина в гомосерин и цистеин. Атом серы поступает в цистеин от метионина, углеродный скелет — от серина.

Рис. 29.11. Реакция, катализируемая фенилаланингидроксилазой. Она осуществляется с участием двух типов активности. Активность II катализирует восстановление дигидробиоптерина за счет NADPH, активность I — восстановление O_2 в H_2O и превращение фенилаланина в тирозин. Нарушения хода этой реакции лежат в основе нарушений метаболизма фенилаланина, которые обсуждаются в гл. 31.

льтате реакции один атом молекулярного кислорода включается в пара-положение фенилаланина, а другой восстанавливается, образуя воду (рис. 29.11). Восстановительные эквиваленты, первоначально поставляемые NADPH, затем передаются непосредственно участвующему в реакции **тетрагидробиоптерину** — птеридину, подобному по структуре фрагменту фолиевой кислоты.

Гидроксилизин

5-Гидроксилизин (α, ε-диамино-δ-гидроксикапроат) входит в состав коллагена и отсутствует в большинстве других белков млекопитающих. Гидроксилизин в составе коллагена происходит из пищевого лизина, но не пищевого гидроксилизина. Перед гидроксилированием лизин должен включиться в пептидную цепь. Гидроксилирование остатка лизина в составе пептида катализируется лизилгидроксилазой — оксигеназой со смешанной функцией, аналогичной пролилгидроксилазе (рис. 29.9).

БИОСИНТЕЗ НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ

Ниже кратко описан биосинтез незаменимых аминокислот, осуществляемый в бактериях из глутамата, аспартата или других амфиболических метаболитов. В тканях млекопитающих эти реакции не происходят.

Аргинин

Аргинин — незаменимая пищевая аминокислота для человека в период его роста — может синтезироваться у крыс, но в таких количествах, которые не достаточны для нормального роста этих животных. В микроорганизмах идет биосинтез аргинина из глутамата с образованием N-ацетилированных интермедиатов. Одним из них является N-ацетилглутамат-γ-полуальдегид, который служит также предшественником пролина у бактерий. У человека, а также у животных пролин образуется из глутамата.

Аспартат является предшественником семейства аминокислот, в которое входят лизин, метионин, треонин и изолейцин (см. рис. 10.6). Регуляция этих процессов у бактерий обсуждалась в гл. 10.

Метионин и треонин

После превращения аспартат-β-полуальдегида в гомосерин пути биосинтеза метионина и треонина расходятся. Взаимопревращения гомосерина и метионина обсуждаются в гл. 31.

Лизин

Бактерии образуют лизин из аспартат-β-полуальдегида путем его конденсации с пируватом. Образующийся при этом дигидропиколинат выполняет также определенную роль при образовании спор у некоторых спорообразующих бактерий; другое промежуточное соединение — диаминопимелат участвует в образовании клеточной стенки бактерий.

Биосинтез лизина в дрожжах начинается с α-кетоглутарата и ацетил-CoA и проходит серию реакций, аналогичных реакциям цикла лимонной кислоты, катализируемых группой ферментов с несколько иной субстратной специфичностью.

Лейцин, валин и изолейцин

Хотя лейцин, валин и изолейцин являются незаменимыми аминокислотами для человека, а также других высших животных, в тканях млекопитающих имеются трансаминазы, катализирующие обратимые взаимопревращения всех трех указанных аминокислот и соответствующих α-кетокислот (см. гл. 31). Этим объясняется способность соответствующих кетокислот заменять рассматриваемые аминокислоты в диете.

Гистидин

Гистидин подобно аргинину может быть назван полунезаменимым. Организм взрослого человека и зрелой крысы в течение некоторого периода может поддерживать азотистый баланс и в отсутствие гистидина. Растущий организм, однако, нуждается в гистидине. Вполне вероятно, что если бы были проведены испытания в течение более длительного периода времени, была бы выявлена потребность в гистидине и у взрослого человека.

Процесс биосинтеза начинается с 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (PRPP), который конденсируется с ATP с образованием N′-(5-фосфорибозил)-ATP. Эта реакция, следовательно, сходна с начальной стадией биосинтеза пуринов.

ЛИТЕРАТУРА

Burnstein P. The biosynthesis of collagen, Annu. Rev. Biochem., 1974, **43**, 567.

Calvo J. M., Fink G. R. Regulation of biosynthetic pathways in bacteria, Annu. Rev. Biochem., 1971, **40**, 943.

Cardinale G. J., Udenfriend S. Prolyl hydroxylase, Adv. Ensimol., 1974, **41**, 245.

Rosenberg L. E., Scriver C. R. Disorders of amino acid metabolism, Chap. ter 11. In: Metabolic Control and Disease, Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds), Saunders, 1980.

Tyler B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 1127.

Umbarger H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 533.

Глава 30

Катаболизм азота аминокислот

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

В этой главе мы рассмотрим, каким образом азот удаляется из аминокислот и превращается в мочевину, а также медицинские проблемы, возникающие при нарушении соответствующих реакций.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Аммиак, образующийся главным образом из α-аминогрупп аминокислот, потенциально токсичен для человека. Механизм этой токсичности до конца не выяснен. Организм избавляется от аммиака, превращая его в нетоксичную мочевину. Нормальный ход метаболического превращения аммиака в мочевину (цикл мочевины) имеет важное значение для сохранения здоровья. При серьезных расстройствах в работе печени — например, при обширном циррозе (замещении нормальных клеток печени фибробластами и коллагеном) или тяжелом гепатите — аммиак накапливается в крови, вызывая определенные клинические симптомы. Лечение детей, страдающих врожденной недостаточностью одного из ферментов цикла мочевины, должно быть основано на понимании биохимии образования мочевины.

Общая картина

У здорового взрослого человека обновление белков в норме составляет 1—2% от общего количества белков тела за сутки и связано преимущественно с деградацией мышечных белков до аминокислот. При этом примерно 75—80% высвободившихся аминокислот снова используется в синтезе белков. Оставшаяся часть метаболизируется до конечных продуктов азотистого обмена, удаляемых из организма, а также превращается в глюкозу, кетоны и (или) углекислый газ (рис. 30.1). Суточная деградация белков составляет 30—40 г. Поскольку примерно 16% массы белка приходится на азот, суточные потери азота составляют 5—7 г. Для поддержания нормального стационарного состояния взрослый организм нуждается в потреблении в среднем 30—60 г белка или эквивалентного количества аминокислот; при этом **важное значение имеет качество белка**. В данном случае речь идет о соответствии содержания незаменимых аминокислот в пищевом белке содержанию их в синтезируемых белках. Независимо от источника аминокислот все те аминокислоты, которые сразу же не входят в состав нового белка, быстро распадаются, т. е. **избыток аминокислот не запасается**. Следовательно, излишнее потребление аминокислот бесполезно: хотя избыточные аминокислоты подвергаются катаболизму с выделением энергии, эту функцию более эффективно выполняют углеводы и липиды.

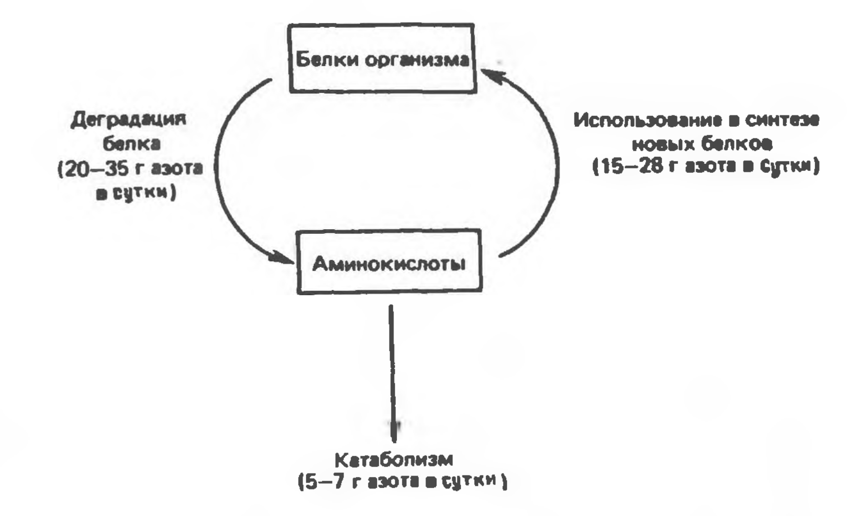


Рис. 30.1. Количественные соотношения при обновлении белков и аминокислот.

Для описания метаболизма азота в диетологии и медицине широко используется ряд терминов. **Азотистый баланс** означает разность между общим количеством азота, поступившим в организм человека (или другой организм), и общим количеством экскретируемого азота. Если азота поступает больше, чем экскретируется, говорят, что данный индивидуум имеет **положительный азотистый баланс**. Важные примеры: период роста и беременности; азотистый баланс положителен как у здорового растущего

ребенка, так и у здоровой беременной женщины. Взрослый человек в норме находится в состоянии **азотистого равновесия**: потребление азота уравновешивается его выделением в составе фекалий и мочи. В состоянии **отрицательного азотистого баланса** количество выделяемого азота превышает количество азота, потребляемого организмом. Важным примером служат больные, потребляющие недостаточное количество азота с пищей (например, при квашиоркоре); такое же состояние наблюдается при прогрессирующих формах рака и в ряде случаев в послеоперационном периоде.

Катаболизм аминокислот

Аминокислоты, поступающие в организм в количествах, превышающих потребности, связанные с биосинтезом белков, не могут запасаться, однако они и не удаляются из организма в неизмененном виде. Аминогруппы избыточных аминокислот отщепляются в процессе переаминирования или окислительного дезаминирования, а углеродный скелет переходит в состав амфиболических интермедиатов. У некоторых организмов (рыб) конечным продуктом катаболизма азота является свободный аммиак; такие организмы называют **аммонотелическими**. Другие организмы (птицы и земноводные) выделяют азот в виде мочевой кислоты, их называют **урикотелическими**. Организмы млекопитающих выделяют азот в виде мочевины и называются **уреотелическими**.

Аммиак токсичен для центральной нервной системы. Механизм токсического действия не совсем ясен, но, по-видимому он связан с обращением реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой (см. ниже), в результате уменьшается количество α-кетоглутарата. Мочевая кислота и ее соли очень слабо растворимы в воде и осаждаются в тканях и межтканевых жидкостях при концентрациях выше нескольких миллиграммов на 100 мл. Следовательно, к этим конечным продуктам метаболизма азота высшие организмы не являются достаточно толерантными. Поэтому человек и другие млекопитающие превращают конечные продукты азотистого обмена в **высокорастворимое нетоксичное соединение — мочевину**.

$$H_2N-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-NH_2$$

Мочевина

Биосинтез мочевины удобно разделить на 4 стадии: 1) переаминирование, 2) окислительное дезаминирование, 3) транспорт аммиака и 4) реакции цикла мочевины. На рис. 30.2 представлена схема катаболизма аминокислотного азота. Хотя каждая из приведенных выше стадий играет определенную роль

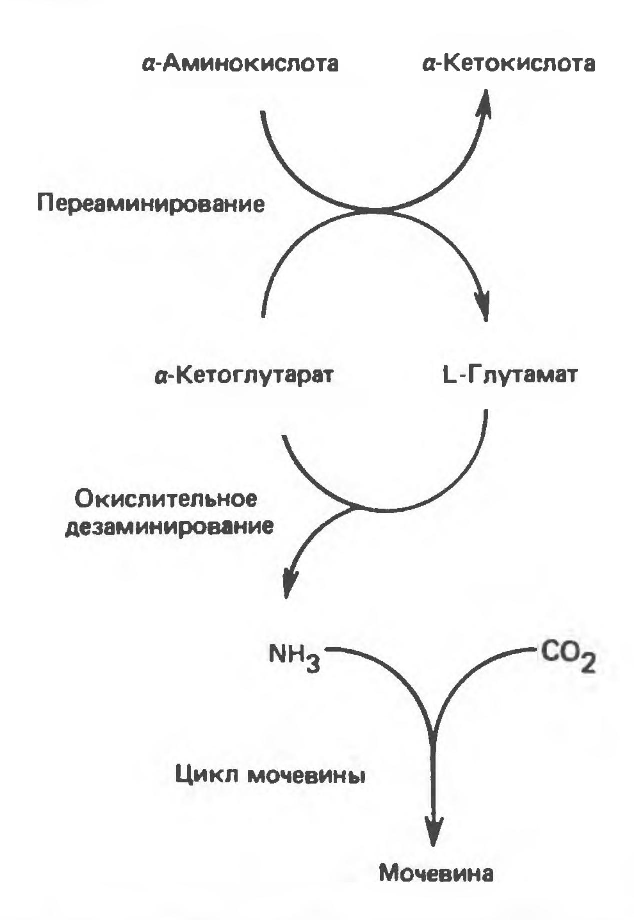


Рис. 30.2. Поток азота в ходе катаболизма аминокислот. Хотя изображенные здесь реакции являются обратимыми, они представлены как однонаправленные, чтобы подчеркнуть направление потока метаболитов в процессе катаболизма аминокислот у млекопитающих.

и в процессах биосинтеза аминокислот (см. гл. 24), в данной главе мы будем их рассматривать с точки зрения катаболизма аминокислот.

ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ

Переаминирование, катализируемое ферментами **трансаминазами (аминотрансферазами)**, представляет собой взаимопревращение пары аминокислот и пары кетокислот. Обычно это α-аминокислоты и α-кетокислоты (рис. 30.3).

Пиридоксальфосфат является обязательным компонентом активного центра трансаминаз и многих других ферментов, для которых субстратами служат аминокислоты. Во всех пиридоксальфосфатзависимых реакциях аминокислот начальной стадией является образование связанного с ферментом интермедиата — шиффова основания. Интермедиат стабилизируется путем взаимодействия с катионной областью активного центра; далее он перестраивается с освобождением кетокислоты и образованием связанного с ферментом пиридоксаминфосфата. Связанная аминоформа кофермента может затем взаимодействовать с кетокислотой, образуя аналогичное шиффово основание. Таким образом, в процессе переаминирования кофермент выполняет роль переносчика аминогруппы. Поскольку константа

Рис. 30.3. Переаминирование. В реакции участвуют две α-аминокислоты и две α-кетокислоты. В переаминировании могут участвовать не только α-амино- или α-карбонильные группы, но такие случаи относительно редки. Реакция легко обратима, константа равновесия близка к единице.

равновесия для большинства реакций переаминирования близка к единице, переаминирование является легко обратимым процессом. Это позволяет трансаминазам функционировать и в процессах катаболизма, и в процессах биосинтеза аминокислот.

В большинстве тканей млекопитающих имеются две трансаминазы: аланин-пируват — трансаминаза (**аланиновая трансаминаза**) и глутамат-α-кетоглутарат — трансаминаза (**глутамат-трансаминаза**). Они катализируют перенос аминогрупп от большинства аминокислот с образованием аланина (из пирувата) или глутамата (из α-кетоглутарата) (рис. 30.4).

Каждая трансаминаза специфична к определенным парам амино- и кетокислот. Поскольку аланин может служить также субстратом глутаматтрансаминазы, аминный азот всех аминокислот, участвующих в переаминировании, может переходить в состав глутамата. Это очень важно, так как **L-глутамат является единственной аминокислотой в тканях млекопитающих, которая может** с существенной скоростью **подвергаться окислительному дезаминированию**. Таким образом, при образовании свободного аммиака из α-аминогрупп аминокислот он переходит главным образом в состав α-аминогруппы L-глутамата.



Рис. 30.4. Действие аланин-трансаминазы (*вверху*) и глутамат-трансаминазы (*внизу*).

Большинство аминокислот (но не все) являются субстратами трансаминаз. Исключение составляют лизин, треонин и циклические иминокислоты пролин и гидроксипролин. Переаминирование не ограничено только α-аминогруппами. Легко вступает в реакцию также δ-аминогруппа орнитина (но не ε-аминогруппа лизина), при этом образуется глутамат-γ-полуальдегид (см. рис. 31.3). При некоторых заболеваниях наблюдается повышение концентрации трансаминаз в сыворотке (см. Приложение).

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ

В печени и почках млекопитающих происходит окислительное превращение многих аминокислот в соответствующие кетокислоты. Большая часть активности в отношении L-α-аминокислот обусловлена сопряженным действием трансаминаз и **L-глутаматдегидрогеназы**, однако в печени и почках млекопитающих имеются также оксидазы L- и D-аминокислот; эти оксидазы имеются и у многих других животных и микроорганизмов. Однако не вполне ясно, какую физиологическую функцию выполняют оксидазы L- и D-аминокислот в тканях млекопитающих.

Оксидазы аминокислот являются **автоокисляемыми флавопротеинами**, т. е. восстановленные FMN или FAD окисляются непосредственно молекулярным кислородом (без участия цитохромов и других переносчиков электронов) с образованием перекиси водорода (H_2O_2) (рис. 30.5). Токсичный продукт H_2O_2 далее расщепляется на O_2 и H_2O **каталазой**, широко распространенной в тканях (особенно много ее в печени). В отсутствие каталазы образующаяся α-кетокислота может декарбоксилироваться неферментативным путем перекисью водорода (H_2O_2) с образованием карбоновой кислоты, имеющей на один атом углерода меньше. Впрочем, представляется маловероятным, чтобы такое декарбоксилирование играло какую-то роль в интактных тканях человека.

В реакциях, катализируемых оксидазами аминокислот (рис. 30.5), сначала происходит дегидрогенирование при участии флавопротеиновой оксидазы, приводящее к образованию α-иминокислоты. Последняя неферментативно присоединяет молекулу воды и превращается в соответствующую α-кетокислоту с потерей α-аминного азота в виде иона аммония.

Оксидаза L-аминокислот, являющаяся FMN-содержащим флавопротеином, у большинства млекопитающих находится только в почках и печени. Ее

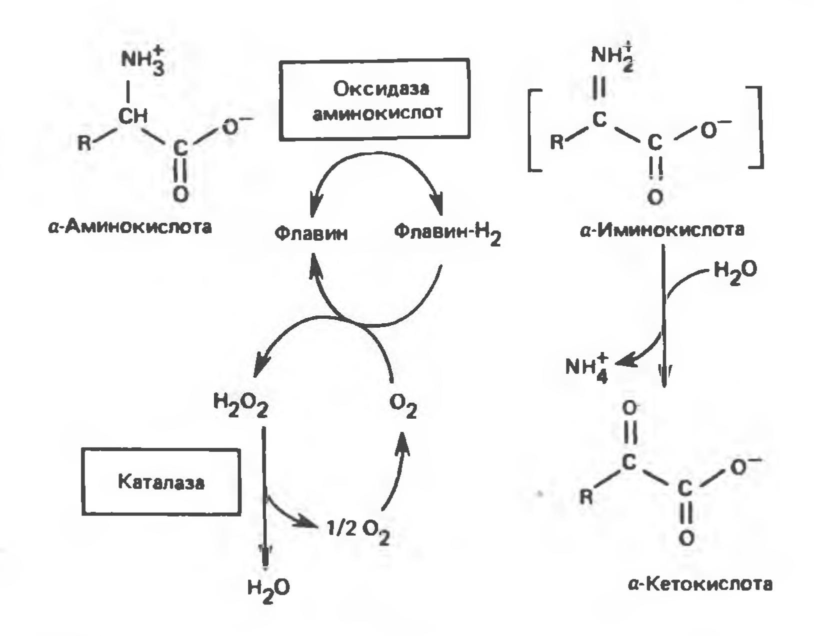


Рис. 30.5. Окислительное дезаминирование, катализируемое оксидазой L-аминокислот (L-α-аминокислота: кислород-оксидоредуктаза). Заключенная в скобки α-иминокислота является нестабильным интермедиатом

активность весьма низка, а на глицин, L-изомеры дикарбоновых аминокислот и β-гидрокси-α-аминокислот она вообще не действует. Едва ли этот фермент играет существенную роль в катаболизме аминокислот у млекопитающих.

Оксидаза D-аминокислот у млекопитающих представляет собой FAD-содержащий флавопротеин, обладающий широкой субстратной специфичностью, фермент обнаружен в печени и почках большинства млекопитающих. D-аспарагин и D-глутамин не окисляются этим ферментом, а глицин и D-изомеры кислых и основных аминокислот являются плохими субстратами. Физиологическое значение этого фермента у млекопитающих неизвестно.

L-Глутаматдегидрогеназа

Аминогруппы большинства аминокислот в конечном итоге путем переаминирования переносятся на α-кетоглутарат с образованием глутамата' (рис. 30.2). Освобождение азота аминогруппы глутамата в виде аммиака катализируется **L-глутаматдегидрогеназой** — ферментом с высокой активностью, широко распространенным в тканях млекопитающих (рис. 30.6). Глутаматдегидрогеназа печени является регуляторным ферментом; ее активность ингибируется аллостерическими эффектами, такими, как ATP, GTP и NADH, и стимулируется ADP. На активность глутаматдегидрогеназы влияют некоторые гормоны.

Глутаматдегидрогеназа может использовать в качестве косубстрата как NAD^+, так и $NADP^+$. Реакция обратима и функционирует в процессах как катаболизма, так и биосинтеза аминокислот. Поэтому ее функция заключается не только в том, чтобы направлять азот из глутамата для синтеза мочевины (катаболизм), но также и в том, чтобы катализировать **аминирование** α-кетоглутарата свободным аммиаком (см. гл. 29).

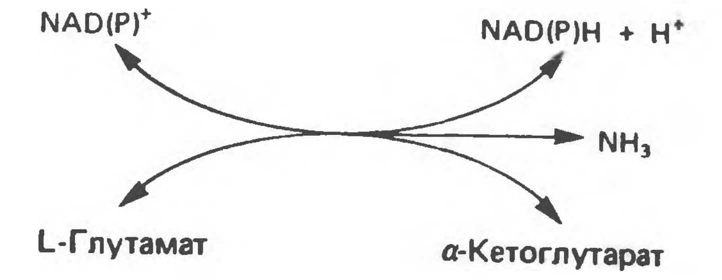


Рис. 30.6. Реакция, катализируемая L-глутаматдегидрогеназой. $NAD(P)^+$ означает либо NAD^+, либо $NADP^+$, т. е. что оба кофермента могут быть использованы в качестве косубстратов. Реакция обратима, но константа равновесия ее благоприятна для образования глутамата.

ОБРАЗОВАНИЕ АММИАКА [1]

Помимо аммиака, образующегося в тканях, значительное количество его образуется кишечными бактериями из пищевого белка, а также из мочевины, содержащейся в жидкостях, секретируемых в желудочно-кишечный тракт. Из кишечника аммиак поступает в кровь венозной воротной системы (для этой крови характерно повышенное содержание аммиака), в нормальных условиях печень быстро извлекает аммиак из крови воротной вены, так что кровь, выходящая из печени (как и вся кровь общей системы кровообращения), практически не содержит аммиака. Это весьма существенно, так как последний даже в небольших количествах токсичен для центральной нервной системы. Симптомами **аммиачного отравления** являются своеобразный тремор, нечленораздельная речь, затуманивание зрения и, в тяжелых случаях, коматозное состояние и летальный исход. Эти симптомы подобны тем, которые характерны для синдрома печеночной комы, развивающейся при повышении концентрации аммиака в крови и, вероятно, в мозгу. Аммиачное отравление, по-видимому, является важным этиологическим фактором печеночной комы. Поэтому лечение направлено, в частности, на снижение уровня аммиака в крови.

При тяжелых нарушениях функции печени, а также при развитии коллатеральных путей между системой воротной вены и общей системой кровообращения (что нередко происходит при циррозе печени) кровь из воротной системы может миновать печень. Тогда содержание аммиака в системе кровообращения может увеличиться до токсического уровня. Хирургические операции по шунтированию воротной

[1] При физиологических значениях pH аммиак присутствует почти исключительно в виде иона NH_4^+.

системы (фистула Экка или другие формы шунтирования) этой системы и нижней полой вены также могут способствовать аммиачному отравлению, особенно после приема белковой пищи, а также после кровоизлияния в желудочно-кишечный тракт, в результате которого белки крови оказываются доступными для действия бактерий толстой кишки.

Содержание аммиака в почечных венах превышает его содержание в почечных артериях, что свидетельствует о продуцировании почками аммиака, который поступает в кровь. Однако экскреция с мочой аммиака, образующегося в клетках почечных канальцев, отражает важный аспект метаболизма аммиака в почках. Образование аммиака в почечных канальцах является важным механизмом регуляции кислотно-основного равновесия и задержки катионов. Оно резко возрастает при метаболическом ацидозе и снижается при алкалозе. Этот аммиак образуется не из мочевины, а из внутриклеточных аминокислот, в особенности из глутамина. Освобождение аммиака катализируется почечной **глутаминазой** (рис. 30.7).

ТРАНСПОРТ АММИАКА

Хотя аммиак может экскретироваться из организма в виде аммонийных солей — особенно при метаболическом ацидозе,— бóльшая его часть выделяется в составе мочевины, главного азотистого компонента мочи. Аммиак постоянно продуцируется в тканях, однако содержится в периферической крови лишь в следовых количествах (10—20 мкг/100 мл); он быстро удаляется из кровеносной системы печенью, где входит в состав глутамата, глутамина или мочевины.

$H_2N-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-C(=O)-O^-$

L-Глутамин

H_2O → NH_4^+ (Глутаминаза)

$^-O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-C(=O)-O^-$

L-Глутамат

Рис. 30.7. Реакция, катализируемая глутаминазой, практически необратима и протекает в направлении образования глутамата и NH_4^+. Следует подчеркнуть, что из глутамина удаляется амидный азот, а не азот α-аминогруппы.

$^-O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-C(=O)-O^-$

L-Глутамат

Mg-ATP, NH_4^+ → Mg-ADP + P_i, H_2O (Глутаминсинтетаза)

$H_2N-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-C(=O)-O^-$

L-Глутамин

Рис. 30.8. Реакция, катализируемая глутаминсинтетазой. Равновесие реакции благоприятно для синтеза глутамина.

Об удалении аммиака с помощью **глутаматдегидрогеназы** уже упоминалось. Образование глутамина катализируется **глутаминсинтетазой** (рис. 30.8) — митохондриальным ферментом, присутствующим в больших количествах в ткани почек. Синтез амидной связи глутамина осуществляется за счет гидролиза одного эквивалента ATP с образованием ADP и P_i. Равновесие этой реакции смещено в направлении синтеза глутамина (см. также гл. 29).

Освобождение амидного азота глутамина в виде аммиака происходит путем гидролитического отщепления аммиака, катализируемого **глутаминазой** (рис. 30.7). Глутаминазная реакция в отличие от реакции, катализируемой глутаминсинтетазой, протекает без участия адениновых нуклеотидов и сильно сдвинута в сторону образования глутамата; в направлении синтеза глутамина она не осуществляется. Таким образом, глутаминсинтетаза и глутаминаза катализируют взаимопревращение свободного аммонийного иона и глутамина (рис. 30.9); это напоминает взаимопревращение глюкозы и глюкозо-6-фосфата с помощью глюкокиназы и глюкозо-6-фосфатазы (см. гл. 17).

Реакция, аналогичная той, которая катализируется глутаминазой, происходит при участии **L-аспарагиназы**, присутствующей в тканях животных, растениях и микроорганизмах. Исследовалась возможность применения аспарагиназы и глутаминазы в качестве противоопухолевых агентов, поскольку некоторые опухоли проявляют аномально высокую потребность в глутамине и аспарагине.

Если в ткани мозга основной путь удаления ам-

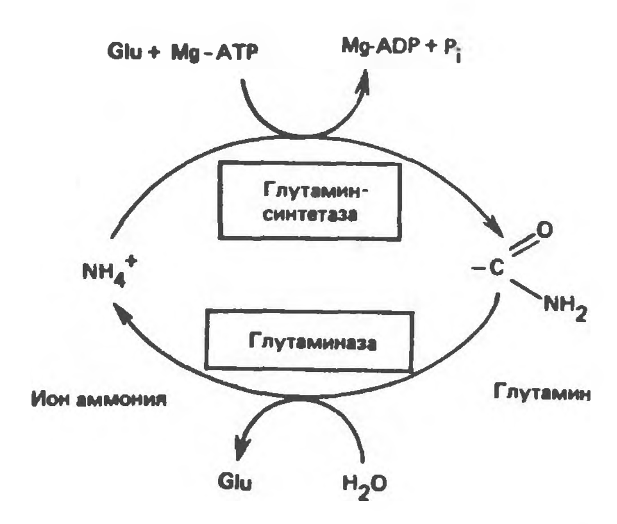


Рис. 30.9. Взаимопревращение аммиака и глутамина, катализируемое глутаминсинтетазой и глутаминазой. Обе реакции идут преимущественно в направлении, указанном стрелками. Таким образом, глутаминаза служит только для дезамидирования глутамина, а глутаминсинтетаза — только для синтеза глутамина из глутамата. Glu — глутамат.

миака состоит в образовании глутамина, то в печени наиболее важным путем является образование мочевины. В ткани мозга тоже может идти образование мочевины, но существенной роли в удалении аммиака этот процесс не играет. Образованию глутамина в мозгу должен предшествовать синтез глутамата, поскольку поступающего с током крови глутамата оказывается недостаточно при высокой концентрации в крови аммиака. Непосредственным предшественником глутамата является α-кетоглутарат. Образование глутамина из аммиака может привести к быстрому снижению концентраций интермедиатов цикла лимонной кислоты, если они не будут пополняться за счет превращения пирувата в оксалоацетат, сопровождающегося фиксацией CO_2 (см. гл. 17). В ткани мозга действительно наблюдается существенное включение в состав аминокислот CO_2, вероятно, после вступления последнего в цикл лимонной кислоты; после введения аммиака дополнительное количество оксалоацетата направляется на синтез глутамина (через стадию α-кетоглутарата).

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТАМИ МЕЖДУ ОРГАНАМИ В ПОСТАБСОРБТИВНОМ СОСТОЯНИИ

Поддержание стационарных концентраций циркулирующих в плазме аминокислот в период между приемами пищи (например, в течение ночи после ужина) зависит от того, насколько сбалансировано поступление аминокислот из эндогенных запасов белка и их использование в различных тканях. На долю мышечной ткани приходится генерация более 50% общего пула свободных аминокислот, тогда как в печени локализованы ферменты цикла мочевины, необходимые для вывода из организма конечных продуктов азотистого обмена. Таким образом, мышцы и печень играют главную роль в определении уровня циркулирующих аминокислот и скорости их обновления.

Мышцы

Более 50% азота α-аминокислот, освобождаемых из мышечной ткани, приходится на аланин и глутамин. Наряду с выходом из мышцы значительных количеств α-аминокислот в мышцу постоянно поступают из системы кровообращения небольшие количества серина, цистеина и глутамата.

Печень и кишечник

Печень и кишечник (внутренние органы) постоянно поглощают из плазмы в больших количествах аланин и глутамин, т. е. те аминокислоты, которые преимущественно освобождаются из мышечной ткани. Печень является главным местом поглощения аланина, тогда как ткань кишечника утилизирует глутамин. В кишечнике большая часть аминогрупп глутамина высвобождается из ткани в составе аланина или в виде аммиака. Внутренние органы так же, как и мышцы, поглощают серин.

Почки

Почки служат главным источником серина и, кроме того, в небольших, но все же существенных количествах поставляют аланин. Почки поглощают из системы кровообращения глутамин, пролин и глицин.

Имеется достаточно хорошее соответствие между выходом большинства аминокислот из мышц и их поглощением внутренними органами.

Мозг

Среди аминокислот, поглощаемых мозгом, преобладает валин. Способность мозга крысы окислять аминокислоты с разветвленной боковой цепью (лейцин, изолейцин и валин) по меньшей мере в 4 раза превышает соответствующую способность мышц и печени. Хотя в постабсорбтивном состоянии значительные количества этих аминокислот освобождаются из мышечной ткани, они не поглощаются печенью, и можно полагать, что главным местом их утилизации является мозг.

На рис. 30.10 представлена общая картина обмена аминокислот в постабсорбтивном состоянии. Свободные аминокислоты, в первую очередь аланин и глутамин, поступают в систему кровообращения из мышечной ткани. Аланин, являющийся, по всей видимости, главной транспортной формой азота

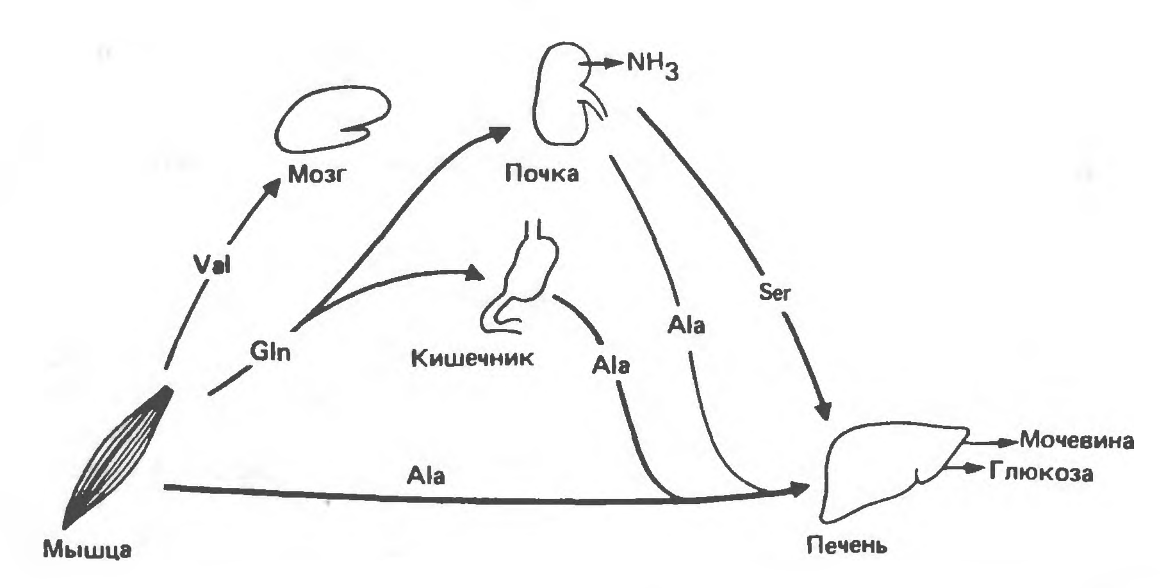


Рис. 30.10. Обмен аминокислот между органами в организме здорового человека после завершения их всасывания в кишечнике. Показаны ключевая роль аланина в потоке аминокислот из мышц и кишечника и поглощение аланина печенью. (Воспроизведено с разрешения автора из обзора Felig P.: Amino acid metabolism in man. *Annu. Rev. Biochem.* 1975:44:937. © 1975 by Annual Reviews. Inc.)

в плазме, поглощается в основном печенью. Глутамин поглощается кишечником и почками — в обоих органах большая часть его превращается в аланин. Глутамин является также основным источником аммиака, экскретируемого почками. Почки являются главным источником серина, поглощаемого различными тканями, в том числе печенью и мышцами. Аминокислоты с разветвленной цепью, особенно валин, освобождаются из мышц и поглощаются преимущественно мозгом.

Аланин служит ключевым предшественником глюкозы белкового происхождения, т. е. он является **глюкогенной аминокислотой** (рис. 30.11). В печени скорость синтеза глюкозы из аланина и серина намного выше скорости синтеза из остальных аминокислот. Способность печени к глюконеогенезу из аланина поразительно велика; она не достигает насыщения даже при концентрации аланина 9 мМ, т. е. в 20—30 раз выше его физиологического уровня. Преобладание аланина среди α-аминокислот, высвобождающихся из мышечной ткани, отражает **синтез** аланина **в мышцах** в ходе переаминирования с участием пирувата.

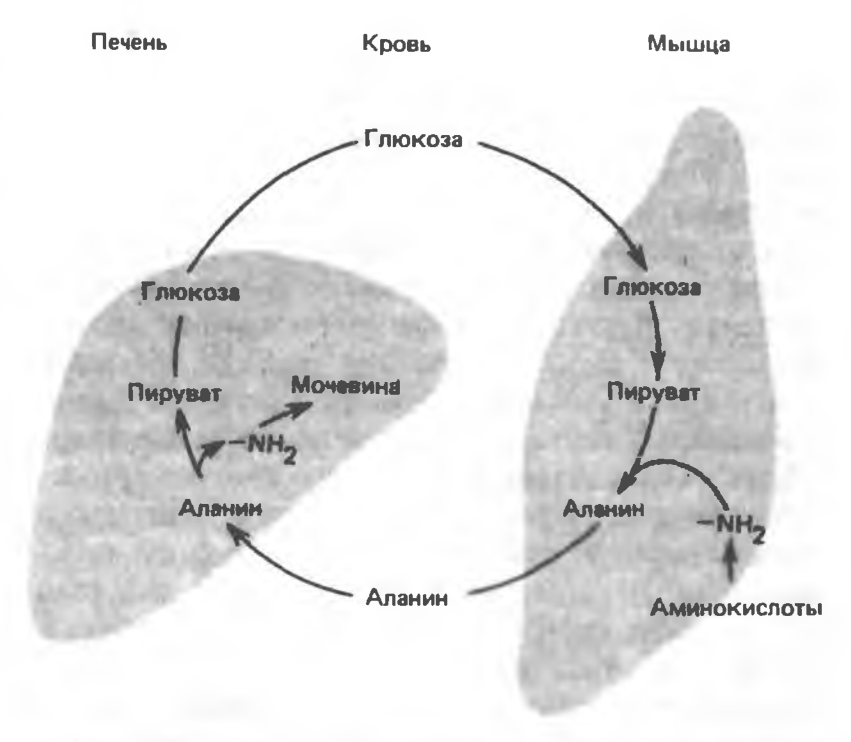


Рис. 30.11. Глюкозо-аланиновый цикл. Аланин синтезируется в мышце путем переаминирования пирувата, образующегося из глюкозы, затем он поступает в кровь и поглощается печенью. В печени углеродный скелет аланина снова переходит в состав глюкозы, которая поступает в кровь и переносится в мышцу, далее она используется для синтеза аланина. (Воспроизведено с разрешения из обзора Felig P.: Amino acid metabolism in man. *Annu. Rev. Biochem.* 1975:44:938. © 1975 by Annual Reviews, Inc.)

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ МЕЖДУ ОРГАНАМИ ПОСЛЕ ПРИЕМА ПИЩИ

После приема пищи, богатой белками, из внутренних органов поступают в кровь аминокислоты, среди которых преобладают соединения с разветвленной боковой цепью (рис. 30.12). На долю валина, изолейцина и лейцина приходится по меньшей мере 60% от общего количества аминокислот, поступающих в общую систему кровообращения (в отличие от воротной системы), даже в тех случаях, когда на долю этих аминокислот в составе белков пищи приходится всего 20% от общего количества аминокислот. При поступлении аминокислот из внутренних органов после приема пищи происходит поглощение аминокислот (преимущественно аминокислот с разветвленной цепью) мышцами. В первый послеобеденный час среди аминокислот, поглощаемых мышечной тканью, по меньшей мере 50% приходится на аминокислоты с разветвленной цепью. Через 2—3 часа доля аминокислот этого типа, поступающих

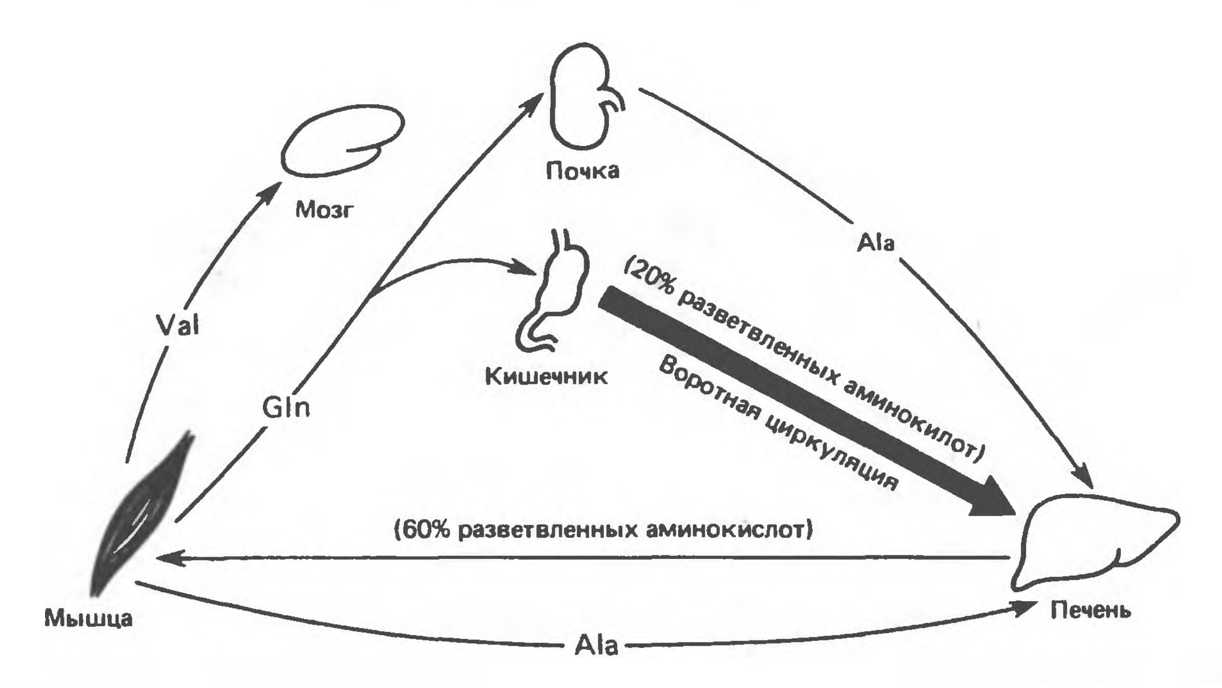


Рис. 30.12. Сводная схема обмена аминокислот между органами сразу после приема пищи.

в периферические ткани, составляет 90—100%. Аминокислоты с разветвленной цепью, которые окисляются в мышце в ответ на прием пищи, являются, вероятно, главным донором аминогрупп, используемых для аминирования пирувата с образованием аланина.

Таким образом, аминокислоты с разветвленной цепью выполняют особую роль в метаболизме азота как в период между приемами пищи, когда они являются источником энергии для мозга, так и сразу после приема пищи, когда они поглощаются преимущественно мышечной тканью. В мышце они, по-видимому, служат важным источником и энергии, и азота.

БИОСИНТЕЗ МОЧЕВИНЫ

Общая картина

Умеренно активный человек, потребляющий в день около 300 г углеводов, 100 г жира и 100 г пищевого белка, должен за сутки выделять около 16,5 г азота. 95% азота удаляется через почки и остальные 5% — в составе фекалий. **Главный путь экскреции азота у человека — в составе мочевины**, которая синтезируется в печени, затем поступает в кровь и экскретируется почками. У людей с режимом питания, характерным для западных стран, на долю мочевины приходится 80—90% экскретируемого азота.

Реакции цикла мочевины

Реакции биосинтеза мочевины и соответствующие интермедиаты представлены на рис. 30.13; в образовании 1 моля мочевины участвуют 1 моль ионов аммония. 1 моль двуокиси углерода (активируемой Mg^{2+} и ATP) и 1 моль α-аминного азота аспартата. В ходе синтеза потребляются 3 моля ATP (2 из них превращаются в ADP и P_i, а третий — в AMP и PP_i), в нем последовательно участвуют пять ферментов, катализирующих реакции 1—5 на рис. 30.13. Из 6 аминокислот, вовлекаемых в синтез мочевины, одна (N-ацетилглутамат) служит активатором одного из ферментов и в химических превращениях не участвует. Остальные пять — аспартат, аргинин, орнитин, цитруллин и аргининосукцинат — служат переносчиками атомов, которые в итоге образуют молекулу мочевины. Первые две из этих аминокислот входят в состав белков, тогда как три другие (орнитин, цитруллин и аргининосукцинат) в состав белков не входят. Главной метаболической ролью этих трех последних аминокислот у млекопитающих является участие в синтезе мочевины. Обратите внимание, что образование мочевины является частично **циклическим процессом**. Орнитин, участвующий в реакции 2, регенерируется в ходе реакции 5. Таким образом, ни потерь, ни накопления орнитина, цитруллина, аргининосукцината и аргинина в ходе синтеза мочевины не происходит; потребляются только ион аммония, CO_2, ATP и аспартат.

Реакция 1: синтез карбамоилфосфата. Конденсация иона аммония, двуокиси углерода и фосфата (поступающего от ATP), которая приводит к образованию карбамоилфосфата, катализируется **карбамоилфосфатсинтазой** — ферментом, находящимся **в митохондриях** печени всех уреотелических организмов, включая человека. Осуществляемый в ходе этой реакции гидролиз двух молекул ATP обеспечивает энергией образование двух ковалентных связей: амидной связи и ангидридной связи при образовании карбамоилфосфата из карбоновой и фосфорной кислот. Для данной реакции требуются ионы Mg^{2+}, а также дикарбоновая кислота, предпочтительно N-ацетилглутамат. В при-

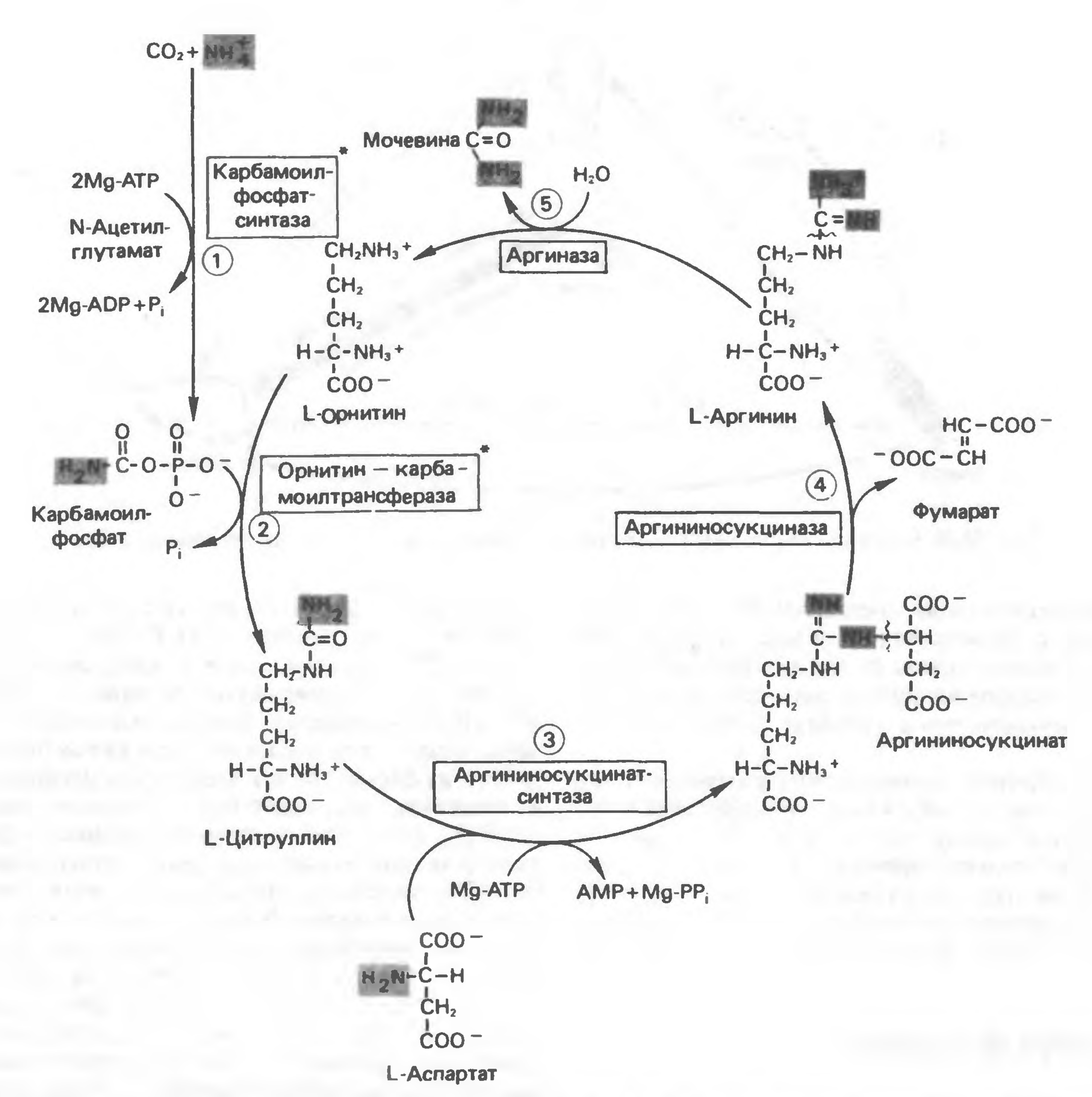


Рис. 30.13. Реакции и интермедиаты при биосинтезе мочевины. Выделены амины, непосредственно участвующие в образовании мочевины. Звездочкой отмечены митохондриальные ферменты.

сутствии этих соединений происходят значительные конформационные изменения структуры карбамоилфосфатсинтазы, в результате которых одни сульфгидрильные группы экспонируются, другие экранируются и увеличивается сродство фермента к ATP.

Реакция 2: синтез цитруллина. Перенос карбамоильной группы с карбамоилфосфата на орнитин с образованием цитруллина и P_i катализируется **L-орнитин-карбамоилтрансферазой** митохондрий печени. Реакция высокоспецифична к орнитину, равновесие ее сильно сдвинуто в направлении синтеза цитруллина.

Реакция 3: синтез аргининосукцината. В реакции, катализируемой аргининосукцинат-синтазой, к цитруллину присоединяется аминогруппа аспартата. Для реакции требуется ATP, равновесие сильно сдвинуто в направлении синтеза аргининосукцината.

Реакция 4: расщепление аргининосукцината на аргинин и фумарат. Обратимое расщепление аргининосукцината на аргинин и фумарат катализируется аргининосукциназой — ферментом, находящимся в печени и почках млекопитающих. Реакция протекает по механизму *транс*-элиминирования. Образовавшийся фумарат может превратиться в оксалоацетат в ходе реакций, катализируемых фумаразой и малатдегидрогеназой; оксалоацетат при переаминировании превращается в аспартат.

Реакция 5: расщепление аргинина на орнитин и мочевину. Эта реакция завершает цикл мочевины и реге-

нерирует орнитин, субстрат реакции 2. Гидролитическое отщепление гуанидиновой группы аргинина катализируется **аргиназой**, присутствующей в печени всех уреотелических организмов. В небольших количествах аргиназа обнаружена также в почках, мозгу, молочных железах, семенниках и в коже. Аргиназа из печени млекопитающих активируется ионами Ca^{2+} или Mn^{2+}. Сильными ингибиторами фермента являются орнитин и лизин, конкурирующие с аргинином.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА МОЧЕВИНЫ

Функциональное взаимодействие между глутаматдегидрогеназой и карбамоилфосфатсинтазой

Карбамоилфосфатсинтаза вместе с митохондриальной глутаматдегидрогеназой направляет азот глутамата (и, следовательно, вообще всех аминокислот, см. рис. 30.2) в карбамоилфосфат и далее в мочевину. Хотя константа равновесия реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой, благоприятствует образованию глутамата, а не аммиака, удаление аммиака карбамоилфосфатсинтазой и окисление α-кетоглутарата в цикле лимонной кислоты способствуют катаболизму глутамата.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ЦИКЛА МОЧЕВИНЫ

Известны метаболические нарушения, обусловленные недостатком каждого из 5 ферментов, катализирующих в печени реакции синтеза мочевины (рис. 30.13). Лимитирующими скорость стадиями, вероятно, являются реакции, катализируемые карбамоилфосфатсинтазой (реакция 1), орнитинкарбамоилтрансферазой (реакция 2) и аргиназой (реакция 5). Поскольку в цикле мочевины аммиак превращается в нетоксичную мочевину, все нарушения синтеза мочевины вызывают аммиачное отравление. Последнее более сильно выражено при блокировании реакции 1 или 2, так как при синтезе цитруллина аммиак уже связан ковалентно с атомом углерода. Клиническими симптомами, общими для всех нарушений цикла мочевины, являются рвота (у детей), отвращение к богатым белками продуктам, нарушение координации движений, раздражительность, сонливость и умственная отсталость.

Клинические проявления и методы лечения всех рассмотренных ниже заболеваний весьма сходны. Значительное улучшение наблюдается при ограничении белка в диете, при этом могут быть предотвращены многие нарушения мозговой деятельности. Пищу следует принимать часто, небольшими порциями, для того чтобы избежать быстрого повышения уровня аммиака в крови.

Гипераммониемия типа I

Описан случай заболевания, связанного с недостатком **карбамоилфосфатсинтазы** (реакция 1, рис. 30.13). Вероятно, это заболевание является наследственным.

Гипераммониемия типа II

Зарегистрированы многочисленные случаи заболевания, связанного с недостатком **орнитинкарбамоилтрансферазы** (реакция 2, рис. 30.13). Это заболевание генетически связано с Х-хромосомой. У матери также наблюдается гипераммониемия и отвращение к богатым белком продуктам. Единственным постоянным лабораторно-клиническим показателем является повышение содержания глутамина в крови, спинномозговой жидкости и моче. Это, по-видимому, отражает повышение синтеза глутамина глутаминсинтазой (рис. 30.8), обусловленное возрастанием уровня аммиака в тканях.

Цитруллинемия

Это редкое заболевание наследуется, вероятно, по рецессивному типу. Для него характерна экскреция с мочой большого количества цитруллина (1—2 $г \cdot сут^{-1}$); значительно повышено содержание цитруллина в плазме и спинномозговой жидкости. У одного из пациентов было зарегистрировано полное отсутствие активности **аргининосукцинат-синтазы** (реакция 3, рис. 30.13). У другого пациента была обнаружена модификация этого фермента. В культуре фибробластов этого больного активность аргининосукцинат-синтазы характеризовалась величиной $K_М$ для цитруллина в 25 раз выше обычной. Вероятно, здесь имела место мутация, вызвавшая значительную, но не «летальную» модификацию структуры каталитического центра фермента.

Цитруллин (а также аргининосукцинат, см. ниже) может служить переносчиком «отработанного» азота, поскольку он содержит азот, «предназначенный» для синтеза мочевины. Потребление аргинина увеличивает экскрецию цитруллина у пациентов с рассматриваемым нарушением. Подобным же образом потребление бензоата «направляет» аммонийный азот в состав гиппурата (через глицин) (см. рис. 32.2).

Аргининосукцинатная ацидурия

Это редкое заболевание, наследуемое по рецессивному типу, характеризуется повышенным содержанием аргининосукцината в крови, спинномозговой жидкости и моче; оно часто сопровождается нарушением роста волос. Хотя известны случаи как раннего, так и позднего проявления болезни, обычно она развивается в возрасте около двух лет и приводит к фатальному исходу в раннем возрасте.

Данное заболевание связано с отсутствием **аргининосукциназы** (реакция 4, рис. 30.13). В культуре фибробластов кожи здорового человека можно зарегистрировать активность этого фермента, а у пациентов с аргининосукцинатной ацидурией он отсутствует. У больных аргининосукциназа отсутствует также в мозге, печени, почках и эритроцитах. Диагноз устанавливается достаточно легко: мочу больного исследуют методом двумерной хроматографии на бумаге, при этом обнаруживается аргининосукцинат. Если анализировать мочу не сразу, а через некоторое время, на хроматограмме появляются дополнительные пятна, принадлежащие циклическим ангидридам, которые образуются из аргининосукцината. Для подтверждения диагноза измеряют содержание аргининосукциназы в эритроцитах. Для раннего диагноза можно анализировать кровь, взятую из пупочного канатика. Поскольку аргининосукциназа содержится также в клетках амниотической жидкости, диагноз может быть сделан путем амниоцентеза (пункции плодного пузыря). По тем же причинам, которые приводились при рассмотрении цитруллинемии, при потреблении аргинина и бензоата у рассматриваемых больных увеличивается экскреция азотсодержащих метаболитов.

Гипераргининемия

Это нарушение синтеза мочевины характеризуется повышенным содержанием аргинина в крови и спинномозговой жидкости, низким содержанием в эритроцитах **аргиназы** (реакция 5, рис. 30.13) и повышением содержания ряда аминокислот в моче, как это имеет место при лизин-цистинурии. Возможно, это отражает конкуренцию между аргинином, с одной стороны, и лизином и цистином, с другой, в процессе реабсорбции в почечных канальцах. Если больного перевести на малобелковую диету, наблюдается понижение уровня аммиака в плазме крови и содержания ряда аминокислот в моче.

ЛИТЕРАТУРА

Adams E., Frank L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines, Annu. Rev. Biochem., 1980, **49**, 1005.

Batshaw M. L. et al Treatment of inborn errors of urea synthesis. Activation of alternative pathways of waste nitrogen synthesis and expression, N. Engl. J. Med., 1982, **306**, 1387.

Felig P. Amino acid metabolism in man, Annu. Rev. Biochem., 1975, **44**, 933.

Msall M. et al. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies, N. Engl. J. Med., 1984, **310**, 1500.

Nyhan W. L. Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism. Patterns of Clinical Expression and Genetic Variation, Wiley, 1974.

Ratner S. Enzymes of arginine and urea synthesis, Adv. Enzymol., 1973, **39**, 1.

Ratner S. A long view of nitrogen metabolism, Annu. Rev. Biochem., 1977, **46**, 1.

Rosenberg L. E., Scriver C. R. Disorders of amino acid metabolism, Chapter 11. In: Metabolic Control and Disease, Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds), Saunders, 1980.

Stanbury J. B. et al. The Metaboli Basis of Inherited Disease, 5th ed., McGraw-Hill, 1983.

Torchinsky Y. M. Transamination: Its discovery, biological and clinical aspects (1937—1987), Irends Biochem. Sci., 1987, **12**, 115.

Tyler B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds, Annu. Rev. Biochem., 1978, **47**, 1127.

Wellner D., Weister A. A survey of inborn errors of amino acid metabolism and transport in man, Annu. Rev. Biochem., 1981, **50**, 911.

Глава 31

Катаболизм углеродного скелета аминокислот

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

В этом разделе речь пойдет о превращениях углеродного скелета обычных L-аминокислот в амфиболические интермедиаты, а также о метаболических заболеваниях — так называемых «врожденных ошибках метаболизма», которые связаны с соответствующими катаболическими путями.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Исторически некоторые нарушения метаболизма аминокислот у человека сыграли ключевую роль в выяснении путей метаболизма аминокислот у здоровых людей. Многие из этих болезней являются редкими, и поэтому большинство практикующих врачей с ними не встречается. Тем не менее эти нарушения представляют большой интерес для психиатров, педиатров, консультантов-генетиков и биохимиков. Они чаще всего проявляются у детей и нередко заканчиваются фатальным исходом в раннем возрасте; при отсутствии соответствующего лечения могут вызывать необратимые изменения мозга. Необходимо, чтобы заболевание было диагностировано возможно раньше и сразу же начато (если возможно) соответствующее лечение. Поскольку активность ряда ферментов, имеющих отношение к рассматриваемым нарушениям метаболизма, тестируется в культуре клеток амниотической жидкости, диагноз можно установить еще до рождения путем амниоцентеза. В настоящее время лечение состоит в назначении диеты, бедной теми аминокислотами, катаболизм которых нарушен; однако в перспективе возможны и более эффективные методы лечения. Например, можно пропускать кровь больного через колонку, в которой «дефицитный» фермент находится в иммобилизованном состоянии, компенсируя таким образом отсутствие или недостаточную активность фермента в организме. В перспективе с помощью метода рекомбинантных ДНК возможна корректировка генетических дефектов («генная терапия»).

Рассматриваемые метаболические нарушения обусловлены генетическими мутациями, приводящими к синтезу белков с измененной первичной структурой. В зависимости от характера изменений первичной структуры возникают различные структурные изменения и на других уровнях. Некоторые изменения первичной структуры не оказывают существенного влияния на активность ферментов; в то же время другие изменения могут значительно влиять на трехмерную структуру каталитического или регуляторного центра (см. гл. 6 и 7). Модифицированный (мутантный) фермент может отличаться по каталитической эффективности (низкое значение V_{max} или высокое K_M) или по способности связывать аллостерический регулятор каталитической активности. В принципе различные мутации могут вызывать одни и те же клинические нарушения. Например, любая мутация, приводящая к значительному снижению каталитической активности аргининосукциназы (см. рис. 30.13), вызовет метаболическое нарушение, известное как аргининосукцинатная ацидемия. Однако маловероятно, чтобы все случаи аргининосукцинатной ацидемии были обусловлены одним и тем же изменением в первичной структуре аргининосукциназы. В этом смысле такие случаи являются различными молекулярными болезнями. В этой главе рассматривается несколько известных нарушений метаболизма аминокислот. Дальнейшие примеры читатель может найти в специализированных руководствах (например, Stanbury et al., 1983).

Мы начнем с путей превращения углеродного скелета L-аминокислот в амфиболические интермедиаты. Затем будут рассмотрены характерные нарушения этих катаболических путей у человека.

ПРЕВРАЩЕНИЕ УГЛЕРОДНОГО СКЕЛЕТА ОБЫЧНЫХ L-α-АМИНОКИСЛОТ В АМФИБОЛИЧЕСКИЕ ИНТЕРМЕДИАТЫ

Превращение углеродных скелетов аминокислот в амфиболические интермедиаты было установлено при изучении различных режимов питания, проведенном в период 1920—1940 гг. Эти данные, подтвержденные и расширенные в исследованиях с использованием меченых аминокислот (в период с 1940

по 1950 г.), сформировали представления о взаимопревращениях углеродных скелетов жиров, углеводов и белков и позволили установить, что аминокислоты могут превращаться либо в углеводы (13 аминокислот), либо в жиры (одна аминокислота), либо и в углеводы, и в жиры (5 аминокислот) (табл. 31.1). Хотя детальное объяснение этих взаимопревращений в то время не представлялось возможным, было, однако, установлено, что они действительно происходят. Как именно они происходят, схематически показано на рис. 31.1.

В дальнейшем изложении индивидуальные аминокислоты будут сгруппированы на основе того, какой из амфиболических интермедиатов является конечным продуктом их катаболизма. Ранней стадией катаболизма аминокислот, часто первой реакцией, является удаление α-азота. Обычно (но не всегда; исключениями являются пролин, гидроксипролин, лизин) это осуществляется путем переаминирования. Азот после отщепления включается в общий метаболический пул. В зависимости от потребностей организма он может реутилизироваться в анаболических процессах (например, в синтезе белка) или, при его избытке, включиться в мочевину и экскретироваться (см. гл. 30). Остающийся после отщепления азота углеродный скелет в большинстве случаев является просто окисленным углеводородом и не может быть идентифицирован как специфическое производное аминокислоты. Он деградирует далее до амфиболических интермедиатов в результате реакций, подобных реакциям катаболизма других окисленных углеводородов (например, линейных или разветвленных жирных кислот). Аналогия с другими путями метаболизма, особенно с метаболизмом жирных кислот (см. гл. 24), поразительно велика. Так, углерод-

Таблица 31.1. Судьба углеродного скелета обычных L-α-аминокислот

Превращаются в амфиболические интермедиаты, из которых образуются			
гликоген («глюкогенные» аминокислоты)		жир («кетогенные» аминокислоты)	гликоген или жир («глюкогенные» или «кетогенные» аминокислоты)
Ala	Hyp	Leu	Ile
Arg	Met		Lys
Asp	Pro		Phe
Cys	Ser		Trp
Glu	Thr		Tyr
Gly	Val		
His			

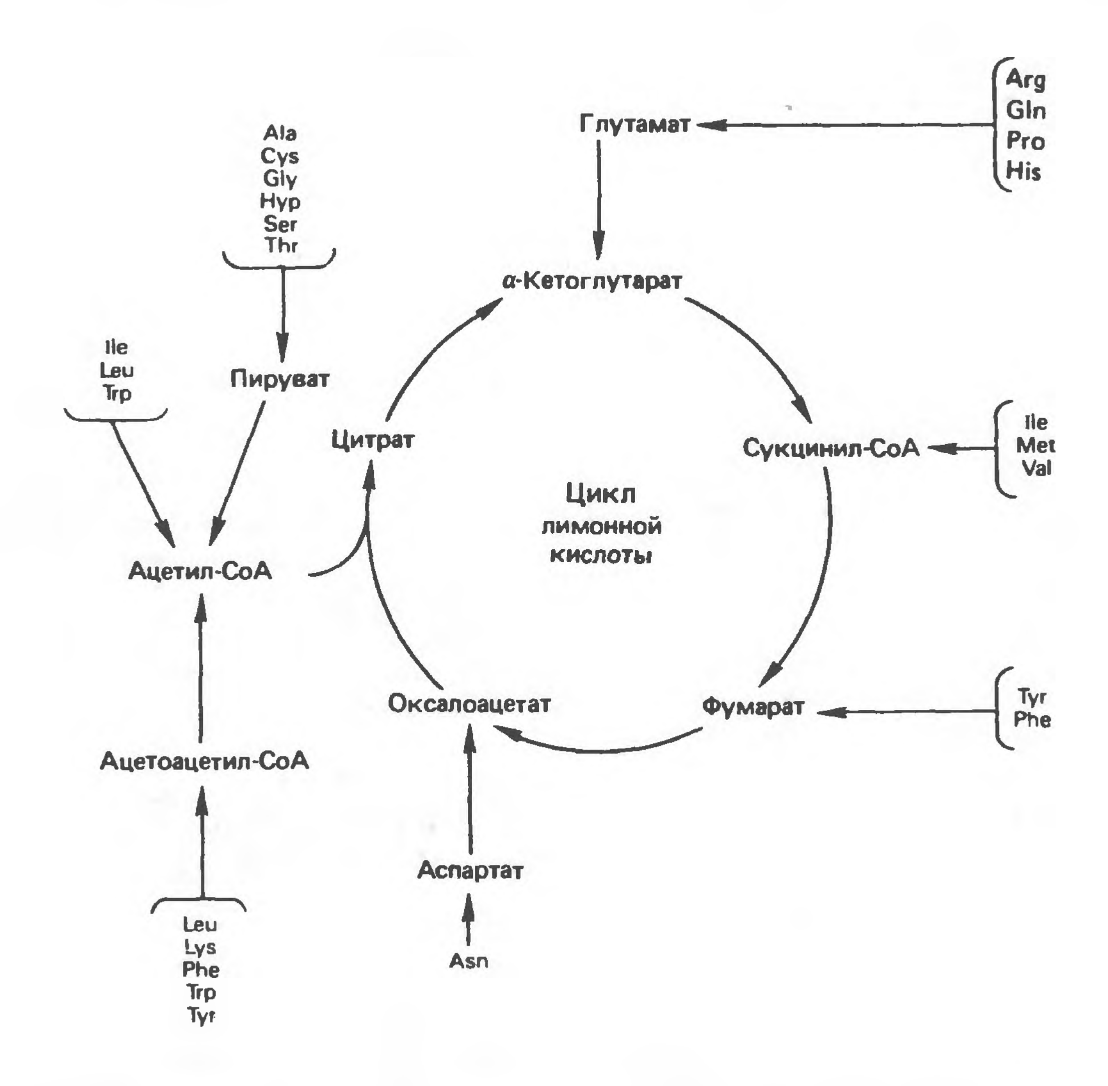


Рис. 31.1. Амфиболические интермедиаты, образующиеся из углеродных скелетов аминокислот.

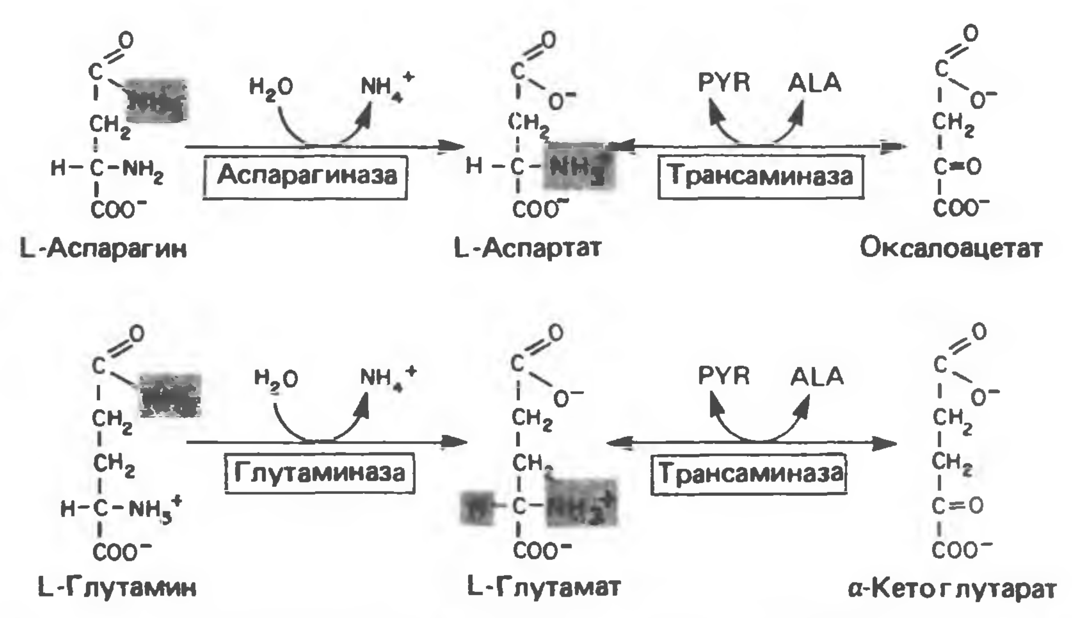


Рис. 31.2. Катаболизм L-аспарагина (*вверху*) и L-глутамина (*внизу*), приводящий к образованию амфиболических интермедиатов. PYR — пируват, ALA — аланин. На этом и последующих рисунках выделены функциональные группы, участвующие в химических превращениях.

ный скелет аминокислот с разветвленной боковой цепью (лейцина, изолейцина и валина) деградирует в результате реакций, аналогичных реакциям катаболизма жирных кислот.

АМИНОКИСЛОТЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ ОКСАЛОАЦЕТАТ

Аспарагин и аспартат

Все четыре углерода аспарагина и аспартата переходят в оксалоацетат при участии аспарагиназы и трансаминазы (рис. 31.2, верхняя часть).

На этом коротком участке катаболического пути не найдено метаболических нарушений; возможно, любой дефект в функционировании трансаминазы оказывается несовместим с жизнеспособностью организма. Трансаминазы выполняют ключевые анаболические и катаболические функции в метаболизме различных аминокислот (см. гл. 29 и следующий ниже текст).

АМИНОКИСЛОТЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ α-КЕТОГЛУТАРАТ

Глутамин и глутамат

Катаболизм глутамина и глутамата протекает подобно катаболизму аспарагина и аспартата, но с образованием α-кетоглутарата — метиленового гомолога оксалоацетата (рис. 31.2, нижняя часть). В то время как глутамат и аспартат являются субстратами одной и той же трансаминазы, дезамидирование аспарагина и глутамина осуществляется различными ферментами. Ферменты, обладающие двойной специфичностью (глутаминазной и аспарагиназной), обнаружены у некоторых бактерий.

Возможно, по тем же причинам, которые упоминались для аспарагина и аспартата, не зарегистрировано метаболических нарушений глутамин-глутаматного катаболического пути.

Пролин

Все 5 углеродов L-пролина переходят в α-кетоглутарат (рис. 31.3, слева). Пролин окисляется в дегидропролин, который при присоединении воды превращается в глутамат-γ-полуальдегид. Последний далее окисляется в глутамат, из которого при переаминировании образуется α-кетоглутарат.

Метаболические нарушения в катаболизме пролина. Описано два генетически различных типа гиперпролинемии. Оба типа — тип I и тип II — наследуются, вероятно, по аутосомно-рецессивному типу. Хотя в половине зарегистрированных случаев наблюдалась умственная отсталость, оба типа гиперпролинемии не считаются опасными для здоровья.

А. Гиперпролинемия типа I. Участком метаболического блока при гиперпролинемии типа I является пролиндегидрогеназа (рис. 31.3). В отличие от гиперпролинемии типа II в этом случае не наблюдается нарушений в катаболизме *гидрокси*пролина. На экспериментальной модели гиперпролинемии типа I, мышах линии Pro/Re, показано, что активность пролиндегидрогеназы печени составляет только 10% от нормы. У гетерозигот типа I гиперпролинемия выражена в легкой форме.

Б. Гиперпролинемия типа II. Степень гиперпролинемии в этом случае выше, чем при гиперпролинемии типа I. Моча содержит Δ^1-пирролин-3-гидрокси-5-карбоксилат. При гиперпролинемии типа II участком метаболического блока является дегидрогеназа, катализирующая окисление

Рис. 31.3. Катаболизм L-пролина (*слева*) и L-аргинина (*справа*), приводящий к образованию L-кетоглутарата. Цифры в кружочках указывают места метаболических нарушений при: 1 — гиперпролинемии типа I, 2 — гиперпролинемии типа II, 3 — гипераргининемии (см. гл. 30).

глутамат-γ-полуальдегида в глутамат (рис. 31.3). Поскольку та же дегидрогеназа функционирует и при катаболизме гидроксипролина, катализируя окисление γ-гидрокси-L-глутамат-γ-полуальдегида в эритро-γ-гидрокси-L-глутамат (рис. 31.12), нарушается катаболизм не только пролина, но и гидроксипролина. У гетерозигот по типу II (в отличие от гетерозигот по типу I) гиперпролинемия не наблюдается.

Аргинин

Из аргинина и гистидина также образуется α-кетоглутарат; при этом из данных шестиуглеродных аминокислот должно быть удалено по одному атому углерода, а также два (гистидин) или три (аргинин) атома азота. В случае аргинина для этого требуется всего одна стадия: гидролитическое отщепление гуанидиновой группы, катализируемое аргиназой.

Образующийся продукт — орнитин далее вступает в реакцию переаминирования по δ-аминогруппе, в результате образуется глутамат-γ-полуальдегид, который затем превращается в α-кетоглутарат, как это описано выше для пролина (рис. 31.3).

Гипераргининемия — метаболическое нарушение катаболизма аргинина, обусловленное недостаточностью фермента аргиназы печени, рассматривалось в гл. 30 в связи с метаболическими нарушениями цикла мочевины.

Гистидин

Для удаления из гистидина «лишних» атомов углерода и азота требуется 4 реакции (рис. 31.4). При дезаминировании гистидина образуется уроканат. Превращение уроканата в 4-имидазолон-5-пропионат, катализируемое уроканазой, включает присоединение воды и внутримолекулярный окислительно-восстановительный процесс. Превращение 4-имидазолон-5-пропионата может идти по ряду путей; на пути образования α-кетоглутарата сначала происходит гидролиз с образованием N-формиминоглутамата, далее формиминогруппа переносится на α-углерод тетрагидрофолата, при этом образуются глутамат и N^5-формиминотетрагидрофолат. У пациентов, страдающих от недостатка фолиевой кислоты, последняя реакция частично или полностью блокируется и N-формиминоглутамат экскретируется с мочой. На этом основан тест на недостаточность фолиевой кислоты; после нагрузки гистидином в моче обнаруживается N-формиминоглутамат.

Метаболические нарушения катаболизма гистидина. Гистидинемия — метаболическое нарушение катаболизма гистидина, обусловленное дефицитом фермента гистидазы (рис. 31.4), наследуется по аутосомно-рецессивному пути. Свыше половины больных гистидинемией характеризуются умственной отсталостью и дефектами речи.

Наряду с повышением уровня гистидина в крови и моче наблюдается также возрастание экскреции имидазолпирувата (при проведении цветной реакции с феррихлоридом следует иметь в виду, что окраску дает также фенилпируват, поэтому иногда ошибочно ставят диагноз «фенилкетонурия»). Метаболической причиной гистидинемии является недостаточная активность гистидазы в печени, вследствие этого замедляется превращение гистидина в уроканат (рис. 31.4). В этом случае создаются благоприятные возможности для реализации альтернативного метабо-

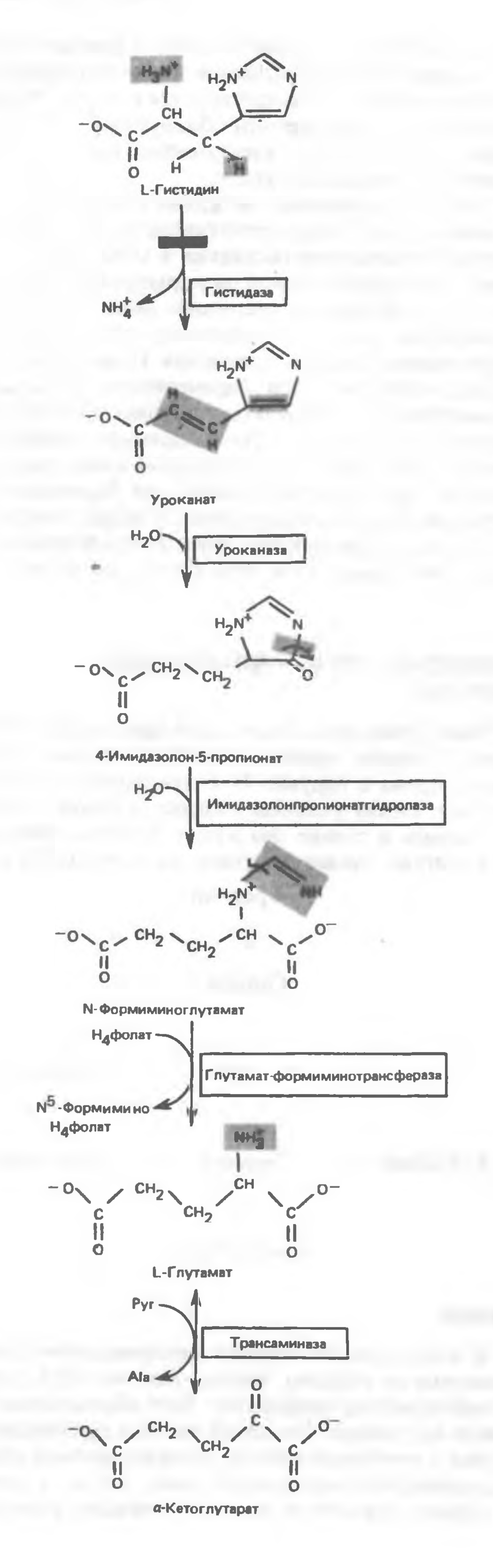


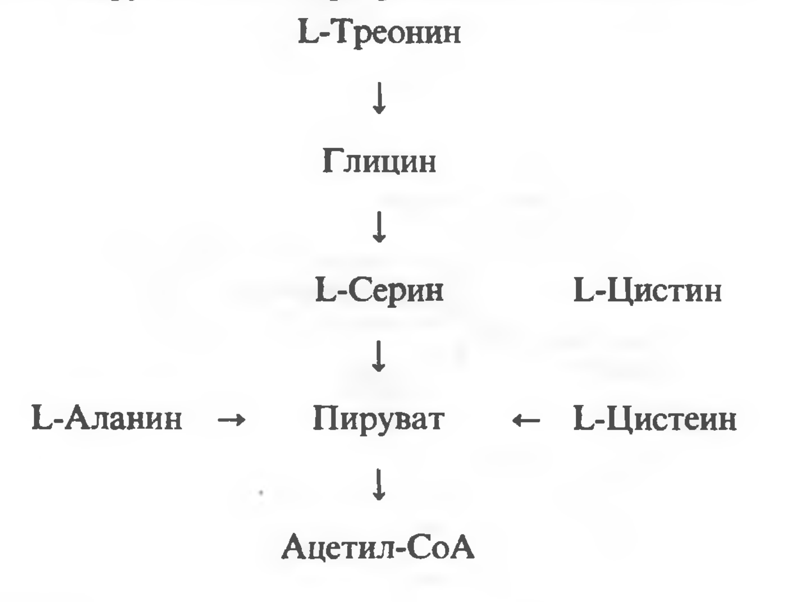
Рис. 31.4. Катаболическое превращение L-гистидина с образованием α-кетоглутарата. H_4фолат — тетрагидрофолат. Реакция, катализируемая гистидазой, является вероятным местом метаболического нарушения при гистидинемии.

лического пути, гистидин вступает в реакцию переаминирования и превращается в имидазолпируват; избыток последнего экскретируется с мочой. В моче пациентов с гистидинемией обнаружены также продукты превращения имидазолпирувата—имидазолацетат и имидазоллактат.

В норме содержание гистидина в моче достаточно велико, и его легко детектировать. Заметное повышение содержания гистидина в моче может служить характерным тестом на нормальную беременность, в то же время содержание аминокислоты не повышается, когда беременность сопровождается возрастанием кровяного давления. Повышенное выделение гистидина при беременности не следует рассматривать как результат нарушения метаболизма этой аминокислоты. Наблюдаемые явления можно объяснить изменением функции почек при нормальной беременности, а также при беременности, сопровождающейся гипертонией. Следует отметить, что в период беременности повышается экскреция не только гистидина, но и ряда других аминокислот.

АМИНОКИСЛОТЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ ПИРУВАТ

Ниже приведена общая схема превращения углеродного скелета аланина, цистеина, глицина, треонина и серина в пируват. В состав пирувата включаются все атомы углерода глицина, аланина, цистеина и серина и только два атома углерода треонина. Далее пируват может превращаться в ацетил-CoA.



Глицин

В число амфиболических интермедиатов, образующихся из глицина, входят пируват, CO_2 и N^5-, N^{10}-метилентетрагидрофолат. При образовании пирувата из глицина последний сначала превращается в серин в результате реакции, катализируемой серингидроксиметилтрансферазой (рис. 31.5), а затем из серина образуется пируват (реакция катализируется сериндегидратазой) (рис. 31.7; см. также следующий ниже раздел «Серин»).

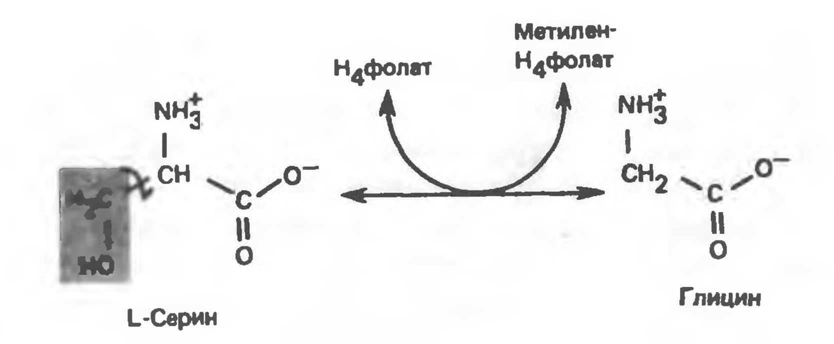


Рис. 31.5. Легко обратимая реакция, катализируемая серингидроксиметилтрансферазой. H_4фолат—тетрагидрофолат.

Главный путь катаболизма глицина у позвоночных—это катализируемое глицинсинтазным комплексом превращение, в результате которого образуются CO_2 и NH_4^+, а метиленовая группа переносится на тетрагидрофолат с образованием N^5-, N^{10}-метилентетрагидрофолата. Эта обратимая реакция (рис. 31.6) напоминает превращение пирувата в ацетил-CoA ферментами пируватдегидрогеназного комплекса. Оба комплекса находятся в митохондриях печени и представляют собой макромолекулярные агрегаты. Реакция расщепления глицина протекает в печени большинства позвоночных, включая человека и других млекопитающих, а также птиц и рептилий.

По-видимому, у человека и многих других позвоночных эта реакция является основным путем катаболизма не только глицина, но и серина (см. ниже раздел «Серин»).

Метаболические нарушения катаболизма глицина. Ниже рассматриваются два вида нарушений метаболизма глицина.

А. Глицинурия. Глицинурия наблюдалась лишь в одной семье. Она характеризуется повышенной экскрецией глицина с мочой и ассоциируется с тенденцией к образованию оксалатных камней в почках, при этом содержание оксалата в моче остается в пределах нормы. Глицинурия, по всей видимости, наследуется как доминантный признак, сцепленный, вероятно, с Х-хромосомой. Уровень содержания глицина в плазме остается нормальным, тогда как количество глицина, экскретируемого с мочой, достигает 600—1000 мг·сут$^{-1}$. Это позволяет сделать заключение, что глицинурия связана с нарушением реабсорбции глицина в почечных канальцах.

Б. Первичная гипероксалурия. Первичная гипероксалурия характеризуется постоянно высокой экскрецией оксалата с мочой, независимо от поступления оксалата с пищей. При развитии болезни наблюдается прогрессирующее двустороннее образование оксалатных камней в мочевыводящих путях;

Рис. 31.6. Обратимое расщепление глицина митохондриальным глицинсинтазным комплексом. PLP — пиридоксальфосфат.

далее развивается нефрокальциноз и рецидивирующая инфекция мочевыводящих путей. Летальный исход наступает в детском или молодом возрасте от почечной недостаточности или гипертонии. Избыток оксалата, очевидно, имеет эндогенное происхождение; вероятно, он образуется из глицина (при дезаминировании последнего образуется глиоксилат — предшественник оксалата). Метаболический дефект, как полагают, состоит в нарушении метаболизма глиоксилата, точнее его превращения в формиат или (путем пераминирования) в глицин. В результате избыток глиоксилата окисляется до оксалата. Вероятно, наследственное нарушение метаболизма — первичную гипероксалурию — можно объяснить сочетанием недостаточности глицин-трансаминазы и нарушения окисления глиоксилата в формиат.

Аланин

В результате переаминирования L-аланина (рис. 31.7) образуется пируват, который далее может декарбоксилироваться с образованием ацетил-СоА.

Вероятно, по тем же причинам, которые были рассмотрены при обсуждении катаболизма глутамата и аспартата, метаболических нарушений катаболизма α-аланина не обнаружено.

Серин

Превращение серина в пируват, катализируемое сериндегидратазой (пиридоксальфосфатсодержащим белком), включает элиминирование воды и гидролитическое удаление аммонийной группы из образующегося интермедиата (рис. 31.7). Печень крысы и морской свинки богата сериндегидратазой; у этих видов превращение серина в пируват при участии данного фермента имеет существенное физиологическое значение, в то время как у человека и многих других позвоночных серин деградирует преимущественно с образованием глицина и N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолата. Эта реакция катализируется серин-гидроксиметилтрансферазой (рис. 31.5). Дальнейший катаболизм серина идет по пути катаболизма глицина (рис. 31.6).

Цистин

Подобно азоту и углероду, сера совершает в биосфере непрерывный кругооборот, который осуществляется за счет метаболической активности прокариотических и эукариотических организмов. Млекопитающие не имеют систем перевода серы в органическую форму; они участвуют в кругообороте, осуществляя катаболическое превращение органических соединений серы в неорганические. Например, человек экскретирует приблизительно 20—30 ммоль серы в сутки, из них по меньшей мере 80% приходится на неорганический сульфат.

Главный метаболический путь цистина у млекопитающих — превращение в цистеин в результате реакции, катализируемой цистинредуктазой (рис. 31.8). Далее катаболизм цистина совпадает с катаболизмом цистеина (см. ниже).

Рис. 31.7. Превращение аланина и серина в пируват. Аланин-трансаминаза и сериндегидратаза в качестве кофактора используют пиридоксальфосфат. В результате реакции, катализируемой сериндегидратазой, происходит элиминирование H_2O из серина, приводящее к образованию ненасыщенной аминокислоты. Последняя перегруппировывается в α-иминокислоту, которая подвергается спонтанному гидролизу с образованием пирувата и аммиака. Таким образом, в уравнение суммарной реакции, катализируемой сериндегидратазой, вода не входит. Glu — глутамат, α-КГ — α-кетоглутарат

Цистин-редуктаза

NADH + H$^+$ → NAD$^+$

L-Цистин → 2 L-Цистеин

Рис. 31.8. Реакция, катализируемая цистинредуктазой.

Цистеин

Цистеин у млекопитающих катаболизирует по двум основным путям: по прямому окислительному (цистеинсульфинатному) пути и по пути переаминирования (3-меркаптопируватному) (рис. 31.9). Первоначально предполагали, что имеется еще и третий путь с участием цистеиндесульфгидразы, который, как было показано, функционирует у бактерий. Однако маловероятно, что этот путь функционирует у млекопитающих, поскольку в их тканях активность цистеиндесульфгидразы не обнаружена.

А. Прямой окислительный путь катаболизма

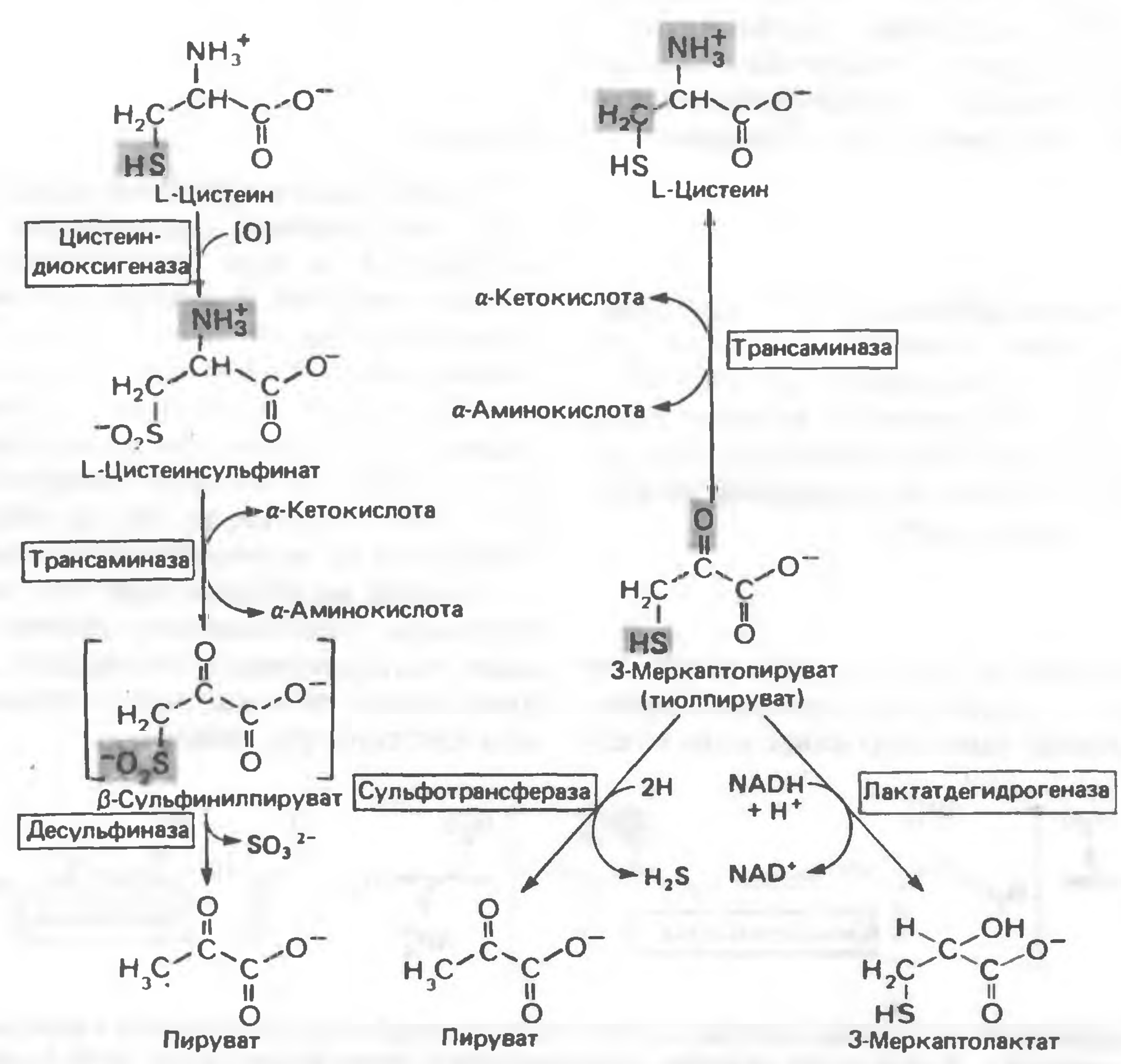


Рис. 31.9. Катаболизм L-цистеина по пути прямого окисления (цистеинсульфинатный путь, *слева*) и переаминирования (3-меркаптопируватный путь, *справа*). β-Сульфинилпируват помещен в скобки, так как образование этого интермедиата экспериментально не доказано. Окисление сульфита в последней реакции прямого окислительного пути катализируется сульфитоксидазой.

цистеина. Превращение цистеина в цистеинсульфинат (рис. 31.9) катализируется цистеиндиоксигеназой — ферментом, функционирующим при участии Fe^{2+} и NAD(P)H. Дальнейший катаболизм цистеинсульфината включает, вероятно, переаминирование с образованием β-сульфинилпирувата. Возможно, что трансаминаза тканей млекопитающих, использующая цистеинсульфинат как донор аминогруппы, идентична классической глутамат:аспартат трансаминазе. Следует, однако, отметить, что предполагаемый продукт трансаминирования β-сульфинилпируват пока еще не был идентифицирован в системе катаболизма цистеинсульфината. Превращение постулируемого интермедиата β-сульфинилпирувата в пируват осуществляется, вероятно, неферментативным путем.

Б. Трансаминазный (3-меркаптопируватный) путь катаболизма цистеина. Обратимое переаминирование цистеина в 3-меркаптопируват (тиолпируват) катализируется специфическими цистеиновыми трансаминазами или аспарагиновой и глутаматной трансаминазами печени и почек млекопитающих (рис. 31.9). 3-Меркаптопируват может далее восстанавливаться в ходе реакции, катализируемой L-лактатдегидрогеназой. Образующийся продукт 3-меркаптолактат является нормальным компонентом мочи человека в форме смешанного дисульфида с цистеином; содержание последнего в моче пациентов с меркаптолактат-цистеин-дисульфидурией возрастает. Альтернативное превращение 3-меркаптопирувата идет по пути отщепления H_2S с образованием пирувата (рис. 31.9).

Нарушения метаболизма серусодержащих аминокислот. В табл. 31.2 приведена сводка данных о нарушениях метаболизма серусодержащих аминокислот. Некоторые из них рассмотрены ниже.

А. Цистинурия (цистин-лизинурия). При этом наследуемом метаболическом заболевании экскреция цистина с мочой в 20—30 раз превышает норму. Значительно повышается также экскреция лизина, аргинина и орнитина. Цистинурию рассматривают как следствие нарушения процессов транспорта в почках. Значительное увеличение у пациентов с цистинурией экскреции с мочой наряду с цистином лизина, аргинина и орнитина позволяет предполагать, что нарушается процесс обратного всасывания всех этих четырех аминокислот, который, возможно, осуществляется в общем для них «участке» реабсорбции; поэтому вместо термина «цистинурия» в настоящее время предпочитают термин цистинлизинурия.

Поскольку цистин слаборастворим, у больных цистинурией может происходить образование цистиновых камней в почечных канальцах. Если такого осложнения не возникает, цистинурия протекает сравнительно доброкачественно и во многих случаях остается недиагностируемой.

```
CH₂ – S – S – CH₂
 |             |
HCNH₃⁺        CH₂
 |             |
COO⁻         HCNH₃⁺
               |
              COO⁻
(Цистеин)   (Гомоцистеин)
```

Рис. 31.10. Смешанный дисульфид цистеина и гомоцистеина.

В моче пациентов с цистинурией был также обнаружен смешанный дисульфид L-цистеина и L-гомоцистеина (рис. 31.10). Это соединение имеет несколько бóльшую растворимость, чем цистин; в той мере, в какой оно образуется вместо цистина, уменьшается тенденция к образованию цистиновых камней.

Б. Цистиноз (болезнь накопления цистина). При цистинозе, который также является наследственным заболеванием, происходит формирование кристаллов цистина во многих тканях и органах (особенно в ретикулоэндотелиальной системе). Обычно при этом заболевании наблюдается общая аминоацидурия, т. е. повышение содержания в моче всех аминокислот. Серьезно нарушается и ряд других функций почек; летальный исход обычно наступает в раннем возрасте при явлениях острой почечной недостаточности. Согласно полученным в последнее время данным, причиной болезни является нарушение функции лизосом.

В. Гомоцистинурии. Частота наследственных нарушений катаболизма метионина оценивается как 1 на 160 000 новорожденных. Гомоцистин экскретируется с мочой (до 300 мг в сутки), в ряде случаев вместе с S-аденозилметионином.

Повышается содержание метионина в плазме. Причиной гомоцистинурии могут быть по крайней мере четыре метаболических нарушения (табл. 31.2). При гомоцистинурии типа 1 клиническими симптомами являются тромбоз, остеопороз, смещение хрусталика глаза и, часто, умственная отсталость. Известны две формы заболевания: витамин B_6-чувствительная и витамин B_6-нечувствительная. Диета с низким содержанием метионина и высоким содержанием цистина может предотвратить патологические изменения, если она соблюдается с раннего возраста. Другие типы цистинурии связаны с нарушениями в цикле реметилирования (табл. 31.2).

Треонин

Треонин расщепляется треонинальдолазой на ацетальдегид и глицин, из ацетальдегида затем образуется ацетил-СоА (рис. 31.11). Катаболизм глицина обсуждался выше.

Таблица 31.2. Врожденные ошибки метаболизма серусодержащих аминокислот

Название	Дефектный фермент	Пояснение
Гомоцистинурия I	Цистатионин-β-синтаза	Рис. 29.10, реакция 1
Гомоцистинурия II	N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолят-редуктаза	
Гомоцистинурия III	Низкая активность N^5-метилентетрагидрофолят: гомоцистеин трансметилазы, обусловленная нарушением синтеза метилкобаламина	
Гомоцистинурия IV	Низкая активность N^5-метилентетрагидрофолят: гомоцистеин трансметилазы из-за нарушения всасывания кобаламина в кишечнике	
Гиперметионинемия	Метионин-аденозилтрансфераза печени [1]	Рис. 31.22
Цистатионинурия	Цистатионаза	Рис. 29.10, реакция 2
Сульфитурия (сульфоцистеинурия)	Сульфитоксидаза	Подпись к рис. 29.8
Цистиноз	Нарушения функции лизосом	
3-Меркаптопируват-цистеин-дисульфидурия	3-Меркаптопируват-сульфидтрансфераза	Рис. 31.9
Синдром нарушения всасывания метионина	Нарушение всасывания метионина в кишечнике	

[1] Может наблюдаться также цистатионинурия, тирозинемия и нетолерантность к фруктозе.

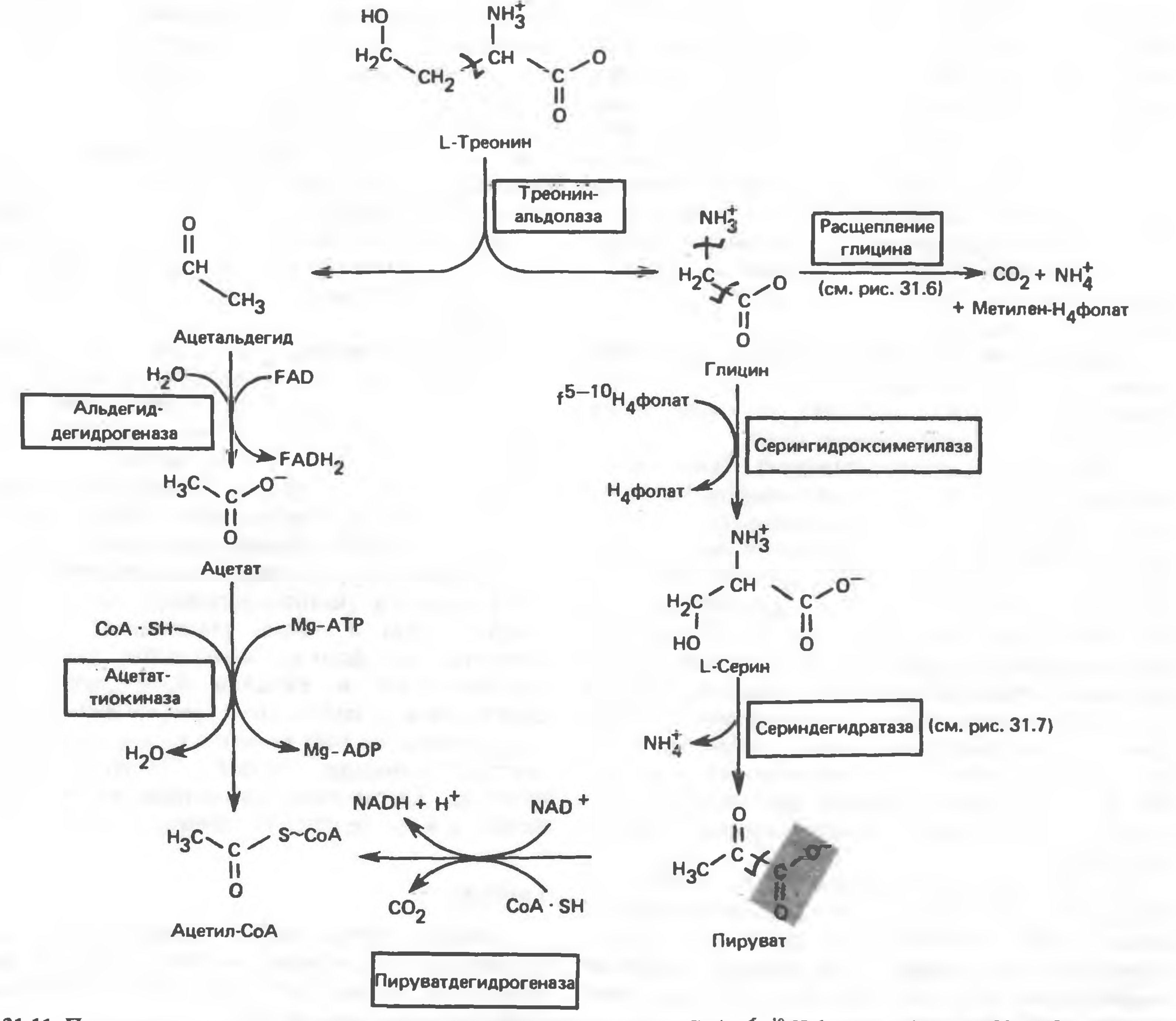


Рис. 31.11. Превращение треонина и глицина в серин, пируват и ацетил-CoA. f^{5-10}·H_4фолат — формил [5—10] тетрагидрофолиевая кислота.

Гидроксипролин

4-Гидрокси-L-пролин превращается в пируват и глиоксилат (рис. 31.12). Митохондриальная дегидрогеназа катализирует превращение гидроксипролина в L-Δ^1-пирролин-3-гидрокси-5-карбоксилат. Последний находится в неферментативном равновесии с γ-гидрокси-L-глутамат-γ-полуальдегидом, который образуется в результате присоединения воды. Полуальдегид окисляется в соответствующую карбоновую кислоту, эритро-γ-гидрокси-L-глутамат, далее при переаминировании образуется α-кето-γ-гидроксиглутарат. При последующем альдольном расщеплении образуются глиоксилат и пируват.

Метаболические нарушения катаболизма гидроксипролина. Гипергидроксипролинемия является метаболическим нарушением, которое характеризуется высоким содержанием в плазме гидроксипролина. Оно наследуется по аутосомно-рецессивному типу и обусловлено дефектом 4-гидроксипролиндегидрогеназы (рис. 31.12). В отличие от гиперпролинемии типа II здесь не нарушается катаболизм пролина, поскольку дефектный фермент участвует только в катаболизме гидроксипролина. Рассматриваемое метаболическое нарушение не влияет на метаболизм коллагена и, подобно гиперпролинемии, является, по-видимому, безопасным.

АМИНОКИСЛОТЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ АЦЕТИЛ-КОФЕРМЕНТ А

Все аминокислоты, образующие пируват (аланин, цистеин, цистин, глицин, гидроксипролин, серин и треонин), могут превращаться в ацетил-СоА. Кроме того, 5 аминокислот образуют ацетил-СоА без промежуточного образования пирувата. К числу этих аминокислот относятся ароматические аминокислоты фенилаланин, тирозин и триптофан, основная аминокислота лизин и нейтральная аминокислота с разветвленной цепью лейцин.

Тирозин

А. Общая последовательность реакций. Пять последовательных ферментативных реакций превращают тирозин в фумарат и ацетоацетат (рис. 31.13): 1) реакция переаминирования с образованием *п*-гидроксифенилпирувата; 2) окисление с миграцией трехуглеродной боковой цепи и декарбоксилирование, приводящее к образованию гомогентизата; 3) окисление гомогентизата до малеилацетоацетата; 4) изомеризация малеилацетоацетата в фумарилацетоацетат и 5) гидролиз фумарилацетоацетата с образованием фумарата и ацетоацетата. Ацетоацетат может далее подвергнуться тиолитическому расщеплению на ацетат и ацетил-СоА.

Несколько интермедиатов метаболизма тирози-

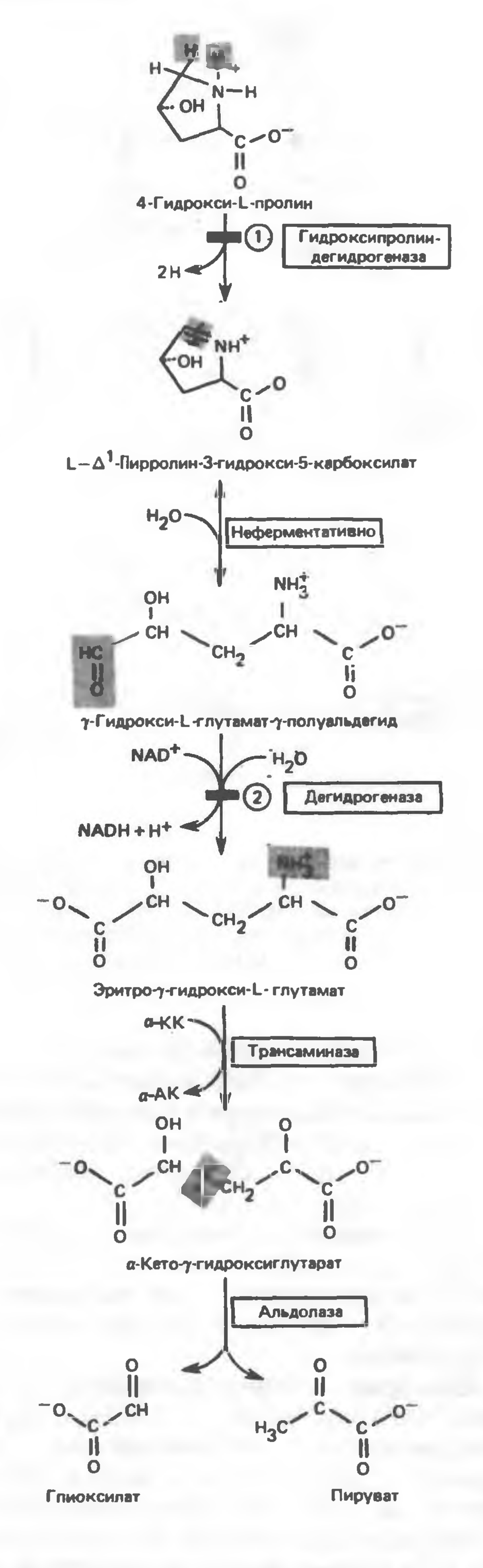


Рис. 31.12. Интермедиаты катаболизма α-гидроксипролина в тканях млекопитающих. α-КК — α-кетокислота, α-АК — α-аминокислота. Цифры в кружочках указывают вероятные места метаболических нарушений при: 1 — гипергидроксипролинемии, 2 — гиперпролинемии типа II.

Рис. 31.13. Интермедиаты катаболизма тирозина. За исключением реакции, катализируемой β-кетотиолазой, все остальные реакции обсуждаются в тексте. Чтобы читателю было легче проследить за судьбой каждого атома углерода, они пронумерованы (см. также рис. 31.15). α-КГ — α-кетоглутарат, Glu — глутамат, PLP — пиридоксальфосфат. Цифры в кружочках указывают вероятные места метаболических нарушений при 1 — тирозинемии типа II, 2 — тирозинемии новорожденных, 3 — алкаптонурии и 4 — тирозинемии типа I, или тирозинозе.

на было идентифицировано при изучении генетического заболевания человека алкаптонурии. Больные алкаптонурией экскретируют с мочой гомогентизат и немало полезной информации было получено при добавлении в пищу пациентов предполагаемых предшественников гомогентизата.

Б. Переаминирование тирозина. Переаминирование тирозина с образованием *п*-гидроксифенилпирувата катализируется **тирозин-α-кетоглутарат-трансаминазой** — индуцируемым ферментом печени млекопитающих.

В. Окисление *п*-гидроксифенилпирувата в гомогентизат. Хотя реакция (рис. 31.13) выглядит как гидроксилирование *п*-гидроксифенилпирувата, сопровождающееся окислительным удалением карбоксильного углерода, в действительности сочетанно происходит миграция боковой цепи и гидроксилирование кольца. ***п*-Гидроксифенилпируват-гидролаза** является медьсодержащим металлопротеином, сходным с **тирозиназой**. Хотя in vitro кофактором реакции могут служить не только аскорбат, но и другие восстанавливающие агенты, больные цингой экскретируют с мочой неполностью окисленные продукты метаболизма тирозина.

Г. Превращение гомогентизата в фумарат и ацетоацетат. Окислительная реакция, приводящая к разрыву бензольного кольца гомогентизата и образованию малоилацетоацетата, катализируется гомогентизат-оксидазой — железосодержащим металлопротеином печени млекопитающих.

Превращение малеилацетоацетата в фумарилацетоацетат является *цис-транс*-изомеризацией относительно двойной связи и катализируется малеилацетоацетат-*цис*,*транс*-изомеразой — (—SH)-зависимым ферментом печени млекопитающих. Гидролиз фумарилацетоацетата, катализируемый фумарилацетоацетат-гидролазой, приводит к образованию фумарата и ацетоацетата. Последний затем может быть превращен в ацетил-CoA и ацетат в реакции, катализируемой β-кетотиолазой (см. гл. 23).

Нарушения катаболизма тирозина. Тяжелые нарушения катаболизма приводят к тирозинемии, тирозинурии и фенолацидурии.

А. Тирозинемия типа I (тирозиноз). Тирозиноз характеризуется накоплением метаболитов, снижаю-

щих активность ряда ферментов и транспортных систем. Патофизиология этого нарушения является, следовательно, весьма сложной. Дефектными ферментами являются, вероятно, фумарилацетоацетат-гидролаза (рис. 31.13) и малеилацетоацетат-гидролаза.

Известны острая и хроническая формы тирозиноза. Острая форма характерна для младенческого возраста, ее признаками являются понос, рвота, «капустный» запах, задержка в развитии. Если не проводится лечение, летальный исход наступает в возрасте 6—8 месяцев из-за недостаточности печени. Хроническая тирозинемия характеризуется сходными, но более умеренно выраженными симптомами; летальный исход наступает в возрасте примерно 10 лет. Содержание тирозина в плазме повышается до 6—12 мг/100 мл, повышено содержание и некоторых других аминокислот, особенно метионина. Лечение включает диету с пониженным содержанием тирозина и фенилаланина, а в ряде случаев также и метионина.

Б. Тирозинемия типа II (синдром Рихнера—Ханхарта). Предполагаемой причиной метаболических нарушений при тирозинемии типа II является недостаточность тирозин-трансаминазы печени (рис. 31.13). Клинические проявления включают повышение содержания тирозина в плазме (4—5 мг/100 мл), характерные поражения глаз и кожи и умеренную умственную отсталость. Отмечались также случаи членовредительства, нарушения тонкой координации движений. Тирозин является единственной аминокислотой, концентрация которой в моче повышена. Тем не менее клубочковая фильтрация и обратное всасывание тирозина остаются в пределах нормы. В число метаболитов, экскретируемых с мочой, входят *п*-гидроксифенилпируват, *п*-гидроксифениллактат, *п*-гидроксифенилацетат, N-ацетилтирозин и тирамин (рис. 31.14).

В. Тирозинемия новорожденных. Причиной болезни считается недостаточность *п*-гидроксифенилпируват-гидроксилазы (рис. 31.13). Повышено содержание в крови тирозина и фенилаланина, а в моче содержание тирозина, *п*-гидроксифенилацетата, N-ацетилтирозина и тирамина. При лечении назначают бедную белком диету.

Г. Алкаптонурия. Это наследственное метаболи-

Рис. 31.14. Альтернативные катаболиты тирозина. *п*-Гидроксифенилацетальдегид является интермедиатом стадии окисления тирамина в *п*-гидроксифенилацетат.

ческое нарушение описано в медицинской литературе еще в XVI в., оно было охарактеризовано в 1859 г. Болезнь представляет значительный исторический интерес, поскольку именно на основе ее изучения Гаррод выдвинул идею о наследственных метаболических нарушениях. Наиболее ярким клиническим проявлением этой болезни является потемнение мочи при условиях доступа воздуха. На более поздних стадиях заболевания наблюдается общая пигментация соединительной ткани (охроноз) и развивается артрит. Причиной болезни является недостаточность **гомогентизат-оксидазы** (рис. 31.13). Субстрат фермента, гомогентизат, экскретируется с мочой; при окислении на воздухе он образует темно-коричневый пигмент. Зарегистрировано свыше 600 случаев заболевания, частота заболевания оценивается в 2—5 случаев на миллион новорожденных.

Алкаптонурия наследуется по аутосомно-рецессивному типу. В настоящее время не найдено диагностических методов выявления гетерозигот. Хотя механизм охроноза не установлен, полагают, что он обусловлен окислением гомогентизата полифенолоксидазой, приводящим к образованию бензохиноацетата, который далее полимеризуется и связывается с макромолекулами соединительной ткани.

Бензохинонацетат

Фенилаланин

Фенилаланин сначала превращается в тирозин при участии фенилаланингидроксилазы (см. рис. 29.11). Распределение изотопной метки в амфиболических продуктах фумарате и ацетоацетате (рис. 31.15) такое же, как и в соответствующих продуктах катаболизма тирозина (рис. 31.13).

Метаболические нарушения катаболизма фенилаланина. Главные метаболические нарушения состоят в блокировании превращения фенилаланина в тирозин (см. рис. 29.12). Можно выделить три причины нарушений: недостаточность фенилаланингидроксилазы (гиперфенилаланинемия типа I, или классическая фенилкетонурия), недостаточность дигидробиоптеринредуктазы (гиперфенилаланинемия типов II и III) и нарушения биосинтеза дигидробиоптерина (гиперфенилаланинемия типов IV и V). Были также зарегистрированы нарушения других типов (табл. 31.3).

Главным последствием **гиперфенилаланинемии типа I (классическая фенилкетонурия, ФКУ)** при отсутствии лечения является умственная отсталость (ниже 70 баллов по стандартному тесту для детей старшего возраста). Дополнительными клиническими симптомами являются припадки, психозы, экзема и «мышиный» запах. При раннем диагнозе и своевременном лечении эти симптомы могут не развиться. В связи с наличием экспериментальных моделей заболевания, а также благодаря возможности путем регулирования диеты предотвращать неизбежное в другом случае состояние, характеризующееся умственной отсталостью, ФКУ служит моделью для изучения этого состояния при других метаболических нарушениях. При классической ФКУ, которая является наследственным нарушением, встречающимся с частотой 1 на 10 000 новорожденных, содержание в печени компонента 1 фенилаланингидроксилазы (см. рис. 29.12) составляет около 25% от нормы; при этом фермент оказывается нечувствительным к регуляторному действию фенилаланина.

Организм пациента оказывается не способным превращать фенилаланин в тирозин, в результате образуются альтернативные катаболиты фенилаланина (рис. 31.16). В их число входят фенилпировиноградная кислота (продукт дезаминирования фенилаланина), фенилмолочная кислота (продукт восстановления фенилпировиноградной кислоты) и фенилуксусная кислота, образующаяся путем декарбоксилирования и окисления фенилпировиноградной кислоты. Большая часть фенилацетата в печени конъюгирует с глутамином и экскретируется с мочой в виде конъюгата фенилацетилглутамина. В табл. 31.4 приведены концентрации метаболитов фенилаланина в крови и моче у пациентов с фенилкетонурией. Присутствие в моче кетокислоты фенилпирувата определило и само название болезни — фенилкетонурия.

L-Фенилаланин

Фумарат + Ацетоацетат + Двуокись углерода

Рис. 31.15. Катаболическая судьба атомов углерода фенилаланина. Распределение изотопной метки в конечных катаболитах фенилаланина (и тирозина).

Таблица 31.3. Типы гиперфенилаланинемии [1)]

Тип	Название болезни	Причина болезни	Метод лечения
I	Фенилкетонурия	Отсутствие Phe-гидроксилазы	Диета с пониженным содержанием Phe
II	Устойчивая гиперфенилаланинемия	Снижение уровня Phe-гидроксилазы	Наблюдение или периодическая диетотерапия
III	Кратковременная легкая гиперфенилаланинемия	Недостаток гидроксилазы в период развития	Тот же, что и в предыдущем случае
IV	Недостаточность дигидроптеридин-редуктазы	Отсутствие или недостаток дигидроптеридин-редуктазы	ДОФА, 5-гидрокситриптофан, карбиДОФА
V	Ненормальная функция дигидробиоптерина	Нарушения в системе синтеза дигидробиоптерина	ДОФА, 5-гидрокситриптофан, карбиДОФА
VI	Устойчивая гиперфенилаланинемия и тирозинемия	Катаболизм тирозина	Диета с низким содержанием Phe
VII	Кратковременная тирозинемия у новорожденных	Ингибирование *n*-гидроксифенилпируват-оксидазы	Витамин C
VIII	Наследственная тирозинемия	Недостаточная активность 1. *n*-гидроксифенилпируват-диоксигеназы 2. цитоплазматической тирозинаминотрансферазы	Диета с низким содержанием Tyr
		Недостаток фумарилацетоацетата	Диета с низким содержанием Tyr плюс инъекции глутатиона

[1)] Данные взяты с некоторыми изменениями из статьии Tourian A., Sidbury J. B.: Phenylketonuria and hyperphenylaninemia (p. 273) in: Stanbury J. B. et al. (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed. McGraw-Hill, 1983.

При блокировании нормальных путей катаболизма фенилаланина на первый план выходят несколько катаболических реакций, которые протекают в нормальной печени, но обычно имеют второстепенное значение. У больных фенилкетонурией в крови и моче появляются фенилпируват, фениллактат, фенилацетат и фенилацетилглутамин (рис. 31.16). Хотя присутствие фенилпирувата в моче больных фенилкетонурией может быть установлено путем простого биохимического анализа, для убедительного диагноза необходимо зарегистрировать повышение содержания фенилаланина в плазме крови.

Прогрессирующее развитие нарушений умственного развития у детей, больных фенилкетонурией, можно предотвратить путем назначения диеты с очень низким содержанием фенилаланина. По достижении шестилетнего возраста эту диету можно отменить, поскольку к этому времени повышенные концентрации фенилаланина и его производных перестают оказывать неблагоприятное действие на мозг.

Содержание фенилаланина в плазме можно измерить с помощью автоматизированного микрометода, для которого требуются пробы крови не более 20 мкл. Следует отметить, что ненормально высокое содержание фенилаланина у детей, больных фенилкетонурией, обнаруживается лишь на третий или четвертый день жизни, поскольку они потребляют незначительное количество пищевого белка. Далее, у недоношенных детей можно получить ложную положительную реакцию в связи с замедленным образованием ряда ферментов метаболизма фенилаланина. Полезным, но не вполне надежным массовым тестом может служить обнаружение повышенного со-

Таблица 31.4. Метаболиты фенилаланина, накапливающиеся в плазме и моче больных фенилкетонурией

Метаболит	Содержание в плазме (мг/100 мл)		Содержание в моче (мг/100 мл)	
	в норме	при фенилкетонурии	в норме	при фенилкетонурии
Фенилаланин	1—2	15—63	30	300—1000
Фенилпируват		0,3—1,8		300—2000
Фениллактат				290—550
Фенилацетат				Повышенное содержание
Фенилацетилглутамин			200—300	2400

Рис. 31.16. Альтернативные пути катаболизма фенилаланина, имеющие особое значение при фенилкетонурии. Указанные реакции протекают также и в печени здоровых людей, но при нормальном функционировании фенилаланингидроксилазы они не имеют существенного значения. Glu — глутамат, Gln — глутамин.

держания фенилпирувата с моче с использованием в качестве реагента хлорида железа.

После введения фенилаланина пациентам с фенилкетонурией содержание этой аминокислоты в крови долгое время остается высоким, что свидетельствует о снижении толерантности к фенилаланину. Вместе с тем ненормально низкая толерантность к введенному фенилаланину и повышенное содержание последнего в период между приемами пищи характерно также и для родителей, больных фенилкетонурией. Таким образом, дефектный ген, ответственный за фенилкетонурию, может быть выявлен и у фенотипически нормальных гетерозиготных родителей.

Лизин

Лизин составляет исключение из общего правила, согласно которому первой стадией катаболизма аминокислоты является удаление α-аминогруппы путем переаминирования. В тканях млекопитающих ни α-, ни ε-аминогруппы L-лизина не участвуют в переаминировании. В организме млекопитающих углеродный скелет L-лизина переходит в состав α-аминоадипата и α-кетоадипата (рис. 31.17). Первоначально полагали, что деградация L-лизина идет через стадию образования пипеколиновой кислоты — циклической иминокислоты. В печени D-лизин действительно превращается в пипеколат, однако распад L-лизина происходит через стадию образования сахаропина (рис. 31.18) — интермедиата биосинтеза лизина у грибов.

L-Лизин сначала конденсируется с α-кетоглутаратом, при этом отщепляется молекула воды и образуется шиффово основание. Далее происходит восстановление этого соединения в сахаропин при участии соответствующей дегидрогеназы (рис. 31.18), а затем окисление сахаропина другой дегидрогеназой. Расщепление продукта водой приводит к образованию L-глутамата и L-α-аминоадипат-δ-полуальдегида. Суммарный эффект этой серии реакций эквивалентен удалению ε-аминогруппы лизина путем переаминирования; L-лизин и α-кетоглутарат превращаются в α-аминоадипат-δ-полуальдегид и глутамат. В качестве кофакторов в процессе участвуют NAD^+ и NADH, при этом в итоге не происходит ни окисления, ни восстановления.

В ходе дальнейшего катаболизма α-аминоадипат путем переаминирования превращается в α-кетоадипат, после чего, вероятно, происходит окислительное декарбоксилирование α-кетоадипата с образованием глутарил-СоА. Лизин является одновременно и гликогенной, и кетогенной аминокислотой; природа же катаболитов глутарил-СоА, образующихся в организме млекопитающих, не установлена.

Метаболические нарушения катаболизма лизина. Описаны два редких метаболических нарушения катаболизма лизина. Оба они являются следствием дефектности ферментов, осуществляющих катаболизм

L-Лизин → → → α-Аминоадипат → α-Кетоадипат

Рис. 31.17. Превращение L-лизина в α-аминоадипат и α-кетоадипат. Несколько стрелок подряд означают промежуточные реакции.

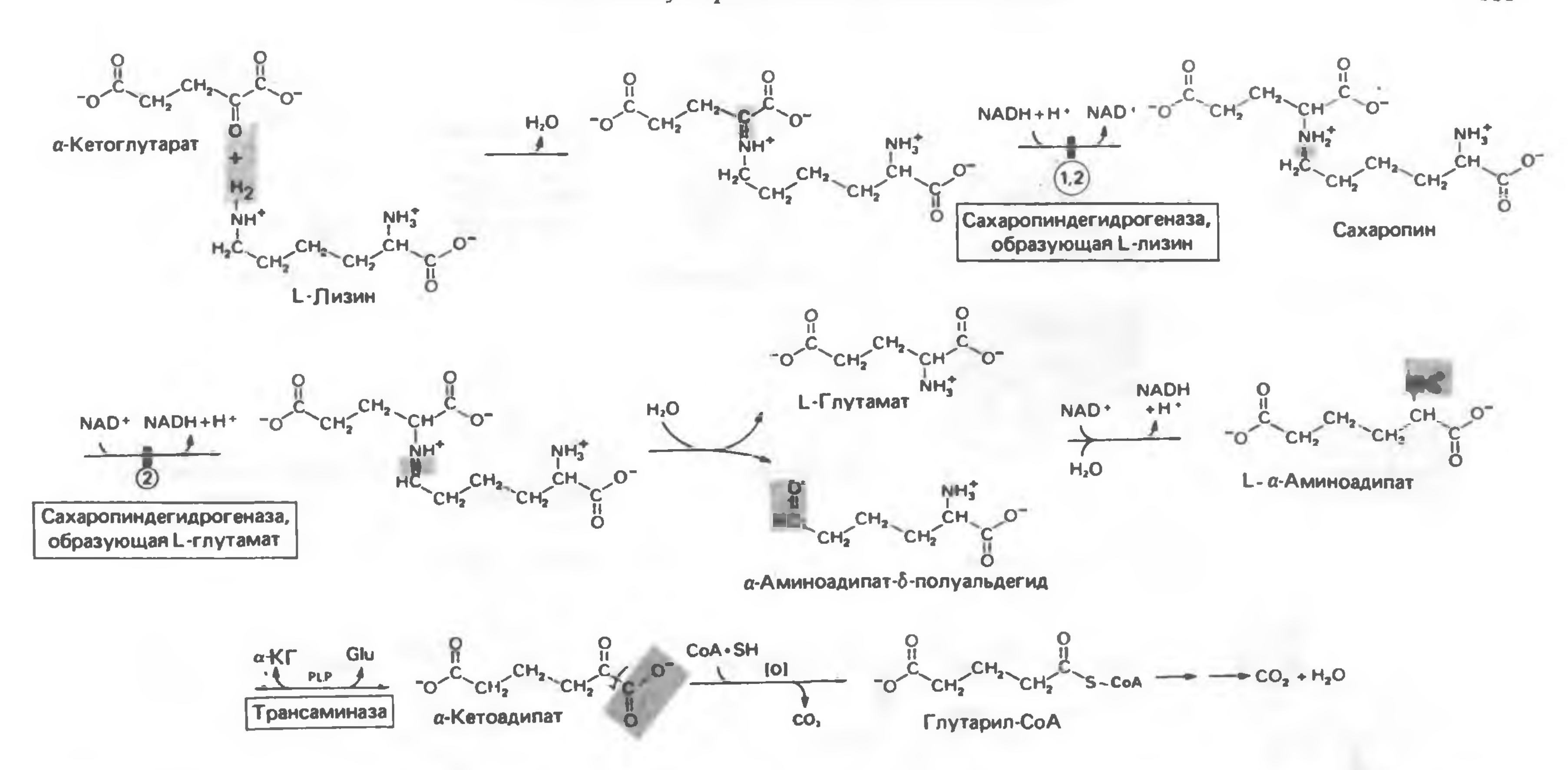


Рис. 31.18. Катаболизм L-лизина (α-КГ — α-кетоглутарат, Glu — глутамат, PLP — пиридоксальфосфат). Цифры в кружочках указывают вероятные места метаболических нарушений при 1 — периодической гиперлизинемии с сопутствующей гипераммонемией, 2 — устойчивой гиперлизинемии без сопутствующей гипераммонемии.

лизина до ацетоацетил-CoA, и в обоих случаях первичное нарушение, вероятно, блокирует превращение L-лизина и α-кетоглутарата в сахаропин (рис. 31.18).

А. Периодическая гиперлизинемия и сопутствующая гипераммониемия. При периодической гиперлизинемии даже потребление белка в нормальных количествах вызывает повышение концентрации лизина в тканях белка. Вторичной по отношению к гиперлизинемии является гипераммониемия, развивающаяся вследствие конкурентного ингибирования лизином активности печеночной аргиназы (см. рис. 30.13).

Увеличение потребления жидкости и снижение содержания лизина в диете понижают уровень гипераммониемии и ослабляют ее клинические проявления. И наоборот, нагрузка лизином вызывает тяжелый криз и коматозное состояние. Пока не имеется данных о генетической природе болезни.

Б. Стойкая гиперлизинемия без сопутствующей гипераммониемии. Клинические и биохимические данные оказались весьма варьирующими у 12 пациентов со стойкой гиперлизинемией. У некоторых больных, но не у всех, наблюдалась умственная отсталость. Сопутствующей гипераммониемии не отмечалось даже после лизиновой нагрузки. В ряде случаев наблюдалось накопление катаболитов лизина в биологических жидкостях. Устойчивую гиперлизинемию рассматривают как аутосомно-рецессивный признак. Наряду с блокированием процесса превращения лизина и α-кетоглутарата в сахаропин у некоторых пациентов, по-видимому, имелось нарушение превращения сахаропина в L-глутамат и α-аминоадипат-δ-полуальдегид (рис. 31.18).

Триптофан

Триптофан вследствие многообразия связанных с ним метаболических реакций и продуктов был одной из первых аминокислот, которые были отнесены к незаменимым. Исследования, проведенные на мутантах *Neurospora* и на бактериях *Pseudomonas*, а также выделение метаболитов триптофана из мочи, оказали неоценимую помощь в выяснении деталей метаболизма триптофана.

При введении с пищей [^{14}C]-триптофана большая часть изотопа включается в состав белков, однако существенная часть обнаруживается в моче в составе различных катаболитов. Атомы углерода боковой цепи и ароматического кольца могут полностью переходить в амфиболические интермедиаты при трансформации триптофана по **кинуренин-антранилатному пути** (рис. 31.19), играющему важную роль в деградации триптофана и в его превращении в **никотинамид**.

Триптофаноксигеназа (триптофанпирролаза) катализирует раскрытие индольного кольца с включением двух атомов молекулярного кислорода в образующийся N-формилкинуренин. Данный фермент

Рис. 31.19. Катаболизм L-триптофана. PLP – пиридоксальфосфат.

является металлопротеином, содержащим железопорфирин; синтез его в печени индуцируется адренокортикостероидами и триптофаном. Значительная часть синтезированного фермента находится в латентной форме и требует активации. Триптофан стабилизирует оксигеназу по отношению к протеолитическим ферментам. Она ингибируется по принципу обратной связи производными никотиновой кислоты, в том числе NADPH.

Гидролитическое удаление формильной группы N-формилкинуренина катализируется в печени млекопитающих **кинуренин-формилазой**. Гидролиз в $H_2{}^{18}O$ приводит к включению атома ^{18}O в образующийся формиат. Фермент также катализирует аналогичные реакции с различными арилформиламинами.

Продуктом реакции, катализируемой кинуренин-формилазой, является **кинуренин** (рис. 31.19). Он может быть дезаминирован в результате реакции переаминирования с переносом аминогруппы боковой цепи на α-кетоглутарат. Образующееся при этом кетопроизводное претерпевает спонтанную циклизацию, превращаясь в кинуреновую кислоту. Это соединение является побочным продуктом катаболизма кинуренина и не относится к катаболитам, образующимся на главном пути (рис. 31.19).

Дальнейший ход метаболизма кинуренина включает его превращение в **3-гидроксикинуренин** и далее в **3-гидроксиантранилат**. Гидроксилирование происходит при участии молекулярного кислорода и осуществляется в NADPH-зависимой реакции гидроксилирования, аналогичной реакции гидроксилирования фенилаланина (см. гл. 29).

Кинуренин и гидроксикинуренин превращаются в гидроксиантранилат при участии пиридоксальфосфат-содержащего фермента **кинурениназы**. Недостаток витамина B_6 приводит к частичной утрате способности к катаболизму этих кинурениновых производных; во внепеченочных тканях они превращаются в **ксантуренат** (рис. 31.20). Этот в норме отсутствующий катаболит появляется в моче человека, обезьян и крыс при недостаточном содержании в пище витамина B_6. В этих условиях введение избыточных количеств триптофана приводит к экскреции ксантурената с мочой.

У многих животных превращение триптофана

3-Гидроксикинуренин

NH_4^+

Ксантуренат

Рис. 31.20. Образование ксантурената в условиях недостаточности витамина B_6. Нарушено превращение катаболита триптофана 3-гидроксикинуренина в 3-гидроксиантранилат (рис. 31.19). Поэтому большая часть катаболита превращается в ксантуренат.

в никотиновую кислоту делает необязательным поступление этого витамина с пищей. У крыс, кроликов, собак и свиней пищевой триптофан может полностью заменить этот витамин; у человека, а также у ряда животных избыточное потребление триптофана с пищей повышает экскрецию с мочой производных никотиновой кислоты (например, N-метилникотинамида). При недостатке витамина B_6 нарушение образования из триптофана никотиновой кислоты может привести к нарушению синтеза пиридиновых нуклеотидов, NAD^+ и $NADP^+$. Если ввести в организм достаточное количество никотиновой кислоты, нормальный синтез пиридиновых нуклеотидов возобновляется даже в отсутствие витамина B_6.

Метаболические нарушения катаболизма триптофана. Болезнь Хартнупа, наследственное нарушение метаболизма триптофана, характеризуется появлением сыпи на коже, как при пеллагре, перемежающейся мозжечковой атаксией и умственной отсталостью. Моча больных содержит значительно повышенные количества индолацетата (α-N-[индол-3-ацетил]глутамина) и триптофана.

АМИНОКИСЛОТЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ СУКЦИНИЛ-КОФЕРМЕНТ А

Суммарные реакции

При катаболическом превращении метионина, валина и изолейцина в амфиболический конечный продукт сукцинил-CoA часть углеродного скелета утрачивается (рис. 31.21). Четыре из пяти атомов углерода валина, три из пяти углеродных атомов метионина и половина углеродных атомов изолейцина переходят в молекулу сукцинил-CoA. Из карбоксильных атомов углерода всех этих аминокислот образуется CO_2. Два концевых атома углерода молекулы изолейцина образуют ацетил-CoA, а S-метильная группа метионина удаляется.

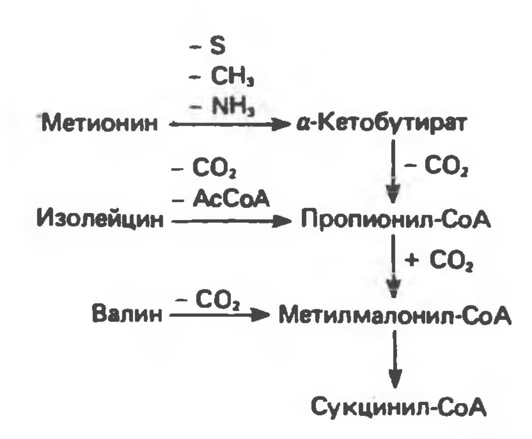


Рис. 31.21. Сводная схема катаболизма метионина, изолейцина и валина, превращающихся в сукцинил-CoA. AcCoA — ацетил-CoA.

Ниже описаны только реакции, которые приводят к превращению метионина и изолейцина в пропионил-CoA и к превращению валина в метилмалонил-CoA. Реакции превращения пропионил-CoA в метилмалонил-CoA и далее в сукцинил-CoA уже обсуждались в гл. 23 в связи с катаболизмом пропионата и жирных кислот с нечетным числом атомов углерода.

Метионин

Из L-метионина при взаимодействии его с ATP образуется S-аденозилметионин («активный метионин») (рис. 31.22). Активированная S-метильная группа может далее переноситься на целый ряд акцепторных соединений [1]. При удалении метильной группы образуется S-аденозилгомоцистеин. В результате гидролиза S—C-связи образуются L-гомоцистеин и аденин. Гомоцистеин далее конденсируется с серином, образуя цистатионин (рис. 31.23). При гидролитическом расщеплении цистатионина образуются L-гомосерин и цистеин, так что суммарный процесс приводит к превращению гомоцистеина в гомосерин и серина в цистеин. Эти же две реакции участвуют в процессе биосинтеза цистеина из серина (см. гл. 29). Гомосерин превращается в α-кетобутират при участии гомосериндезаминазы (рис. 31.24). Затем происходит превращение α-кетобутирата в пропионил-CoA, оно осуществляется по обычному пути окислительного декарбоксилирования α-кетокислот (пирувата, α-кетоглутарата) с образованием ацил-CoA-производных.

Метаболические нарушения катаболизма метионина. См. табл. 31.2.

---

[1] К соединениям, которые получают метильную группу от S-аденозилметионина, относятся бетаины, холин, креатин, адреналин, мелатонин, саркозин, N-метилированные аминокислоты, нуклеотиды и многие растительные алкалоиды.

Рис. 31.22. Образование S-аденозилметионина. $\sim CH_3$ — группа «активного метионина», обладающая высоким потенциалом переноса.

L-Метионин + ATP
H_2O → P_i + PP_i
L-Метионин-аденозилтрансфераза
S-Аденозил-L-метионин ("активный метионин")

L-Метионин
ATP → $P_i + PP_i$
S-Аденозил-L-метионин
Акцептор → CH_3-Акцептор
S-Аденозил-L-гомоцистеин
H_2O → Аденозин
L-Гомоцистеин + L-Серин
Цистатионин-β-синтаза
→ H_2O
Цистатионин
H_2O → NH_4^+
L-Цистеин
α-Кетобутират (см. рис. 31.24)
CoA•SH, NAD^+ → CO_2, $NADH + H^+$
Пропионил-CoA

Рис. 31.23. Превращение метионина в пропионил-CoA.

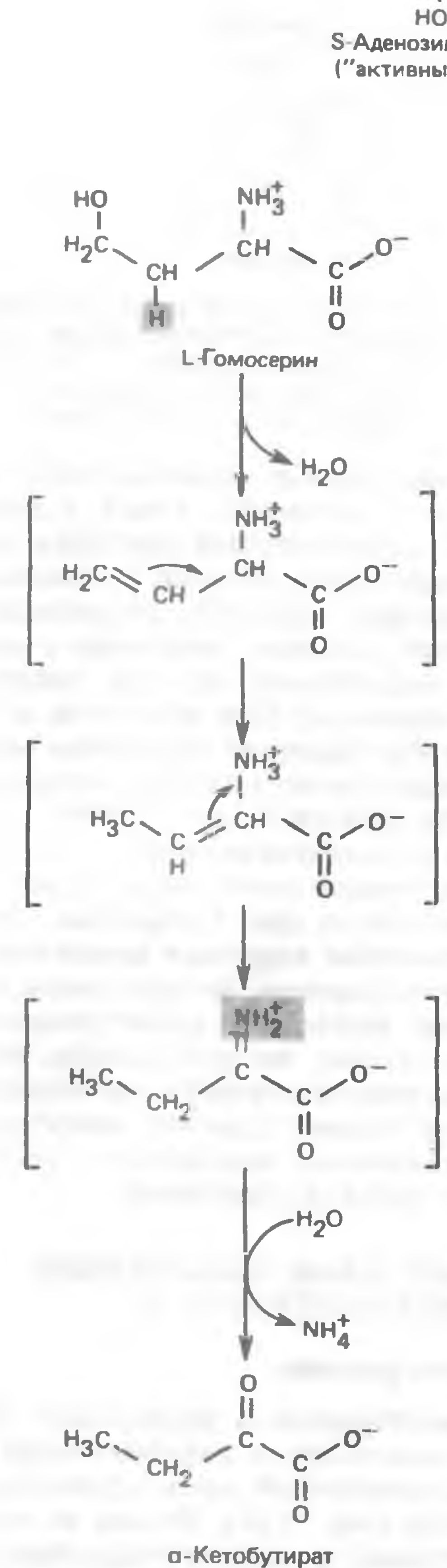


Рис. 31.24. Превращение L-гомосерина в α-кетобутират, катализируемое гомосериндезаминазой.

Лейцин, валин и изолейцин

Как и можно было предполагать, учитывая структурное сходство L-лейцина, L-валина и L-изолейцина, их катаболизм на первых этапах идет по общему пути. Затем этот путь разветвляется и скелет каждой аминокислоты трансформируется по собственному пути с образованием амфиболических интермедиатов (рис. 31.25 и 31.26). В зависимости от природы этих амфиболических конечных продуктов аминокислоты относят к типу гликогенных (валин), кетогенных (лейцин) или к обоим типам (изолейцин). **Многие из рассматриваемых реакций аналогичны реакциям катаболизма жирных кислот с линейными и разветвленными цепями.** В силу сходства начальных реакций катаболизма всех трех аминокислот, которое видно на рис. 31.26, их удобно рассматривать вместе. В последующем тексте номера реакций будут соответствовать тем, которые приведены на рис. 31.26—31.29.

А. Переаминирование. Обратимое переаминирование (реакция 1) всех трех разветвленных L-α-аминокислот в тканях млекопитающих осуществляется, вероятно, одной и той же трансаминазой. Обратимостью этой реакции объясняется возможность замены в диете L-α-аминокислот соответствующими α-кетокислотами, если организму доступны адекватные источники азота.

Б. Окислительное декарбоксилирование с образованием ацил-СоА-тиоэфиров. Эта реакция (реакция 2) аналогична окислению пирувата до ацетил-СоА и CO_2 пируватдегидрогеназой и окислению α-кетоглутарата до CO_2 и сукцинил-СоА α-кетоглутаратдегидрогеназой (см. гл. 18). У млекоптающих дегидрогеназа разветвленных α-кетокислот является митохондриальным мультиферментным комплексом, катализирующим окислительное декарбоксилирование α-кетоизокапроата (из лейцина), α-кето-β-метилвалерата (из изолейцина) и α-кетоизовалерата (из валина).

Субъединицы дегидрогеназного комплекса α-кетокислот аналогичны соответствующим субъединицам пируватдегидрогеназы. Комплекс включает субъединицы с декарбоксилазной (по отношению к α-кетокислотам), трансацилазной и дигидролипоилдегидрогеназной активностями. Как и в случае пируватдегидрогеназы, данный комплекс инактивируется при фосфорилировании за счет АТР в реакции, катализируемой протеинкиназой. Ca^{2+}-Независимая фосфопротеинфосфатаза катализирует дефосфорилирование комплекса и, следовательно, реактивирует его. Таким образом, перевод фермента в фосфорилированное состояние может регулировать катаболизм аминокислот с разветвленной цепью. Протеинкиназа ингибируется ADP, α-кетокислотами с разветвленной цепью, гиполипидемическим агентом клофибратом и дихлорацетатом, а также тиоэфирами кофермента А (например, ацетоацетил-СоА). Из разветвленных α-кетокислот самым сильным ингибитором является α-кетоизокапроат (α-кетолейцин).

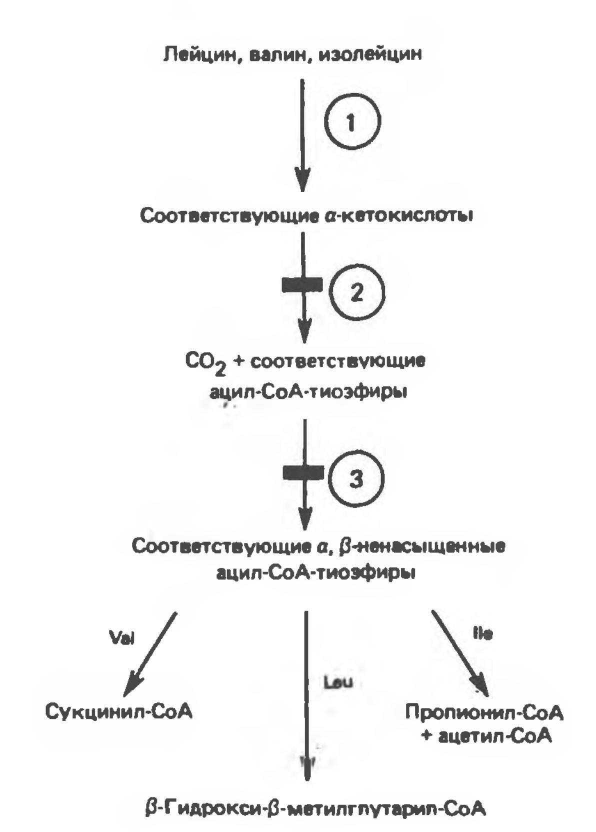


Рис. 31.25. Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью у млекопитающих. Реакции 1—3 — общие для всех трех аминокислот; далее пути их катаболизма расходятся. Перечеркнутые стрелки показывают стадии, на которых метаболизм блокирован в случае двух редко встречающихся заболеваний: 2 — болезни «кленового сиропа» (нарушен катаболизм всех трех аминокислот), 3 — изовалериановой ацидемии (нарушен катаболизм лейцина).

В. Дегидрогенирование с образованием α, β-ненасыщенных тиоэфиров ацил-СоА. Эта реакция (реакция 3) аналогична дегидрогенированию линейных ацил-СоА тиоэфиров в процессе катаболизма жирных кислот. Пока неизвестно, катализирует ли дегидрогенирование всех трех разветвленных ацил-СоА тиоэфиров одна и та же дегидрогеназа. Косвенные данные указывают на участие по крайней мере двух ферментов; они основаны на обследовании пациентов с **изовалериановой ацидемией**, у которых после приема обогащенной белком пищи в крови накапливается изовалерат; при этом содержание других разветвленных α-кетокислот не повышается. Изовалерат образуется путем деацилирования изовалерил-СоА, являющегося субстратом упомянутой выше дегидрогеназы.

Реакции, специфичные для катаболизма лейцина (рис. 31.27)

Реакция 4L: карбоксилирование β-метилкротонил-СоА. Ключевым наблюдением, позволившим объяснить кетогенное действие лейцина, было обна-

Рис. 31.26. Сходство трех первых реакций катаболизма лейцина, валина и изолейцина. Обратите внимание, что реакции 2 и 3 сходны также с соответствующими реакциями катаболизма жирных кислот. Подобная аналогия обнаруживается и на ряде последующих стадий (см. последующие рисунки).

ружение того факта, что при превращении концевой изопропильной группы лейцина в ацетоацетат происходит «фиксация» (т.е. ковалентное связывание) 1 моля CO_2 на моль изопропильных групп. Этой фиксации (реакция 4L, рис. 31.27) предшествует осуществляемое за счет энергии АТР присоединение CO_2 к связанному с ферментом биотину с образованием биотинил-CO_2. В результате фиксации CO_2 образуется интермедиат β-метилглутаконил-СоА.

Реакция 5L: присоединение воды по двойной связи β-метилглутаконил-СоА. Продукт реакции β-гидрокси-β-метилглутарил-СоА служит предшественником не только кетоновых тел (реакция 6L, рис. 31.27), но также и мевалоната, который далее может превращаться в холестерол и другие полиизопреноиды (см. гл. 28).

Реакция 6L: расщепление β-гидрокси-β-метилглутарил-СоА. Реакция, в ходе которой из β-гидрокси-β-метилглутарил-СоА образуются ацетил-СоА и ацетоацетат, протекает у млекопитающих в митохондриях клеток печени, почек и сердца. Этим процессом объясняется сильное кетогенное действие лейцина, поскольку на 1 моль лейцина наряду с 1 молем ацетоацетата образуется опосредованно еще 1/2 моля кетоновых тел из ацетил-СоА (см. гл. 28).

Реакции, специфичные для катаболизма валина (рис. 31.28)

Реакция 4V: гидратация метилакрилил-СоА. Эта реакция, идущая достаточно быстро и в отсутствие фермента, катализируется кротоназой, представляющей собой гидролазу с широкой специфичностью, действующую на L-β-гидроксиацил-СоА-тиоэфиры, содержащие в оксиацильной части 4—9 атомов углерода.

Реакция 5V: деацилирование β-гидроксиизобутирил-СоА. Поскольку СоА-тиоэфир не является субстратом последующей реакции (реакция 6V, рис. 31.28), он должен быть сначала деацилирован в β-гидроксиизобутират (реакция 5V, рис. 31.28). Эта реакция катализируется деацилазой, присутствующей во многих животных тканях; деацилаза может действовать также еще на один субстрат — β-гидроксипропионил-СоА.

Реакция 6V: окисление β-гидроксиизобутирата. В тканях млекопитающих содержится фермент, ка-

Рис. 31.27. Катаболизм β-метилкротонил-CoA, образующегося из L-лейцина (см. рис. 31.26). Звездочкой отмечены атомы углерода, поступившие из CO_2. Структура биотинил-CO_2 показана на рис. 20.4.

тализирующий NAD^+-зависимое окисление первичной спиртовой группы β-гидроксиизобутирата в альдегидную (реакция 6V, рис. 31.28) с образованием метилмалонового альдегида. Реакция легко обратима.

Реакция 7V: дальнейшие превращения метилмалонового полуальдегида. Дальнейший метаболизм метилмалонового полуальдегида в тканях млекопитающих может идти по двум путям: в результате переаминирования из него образуется β-аминоизобутират (реакция 7V, рис. 31.28), а при превращении по пути, изображенному на рис. 31.28 (реакции 8V—10V),—в сукцинил-CoA. Переаминирование с образованием α-аминоизобутирата—аминокислоты, в норме присутствующей в моче,—осуществляется в различных тканях млекопитающих, в том числе в почках. Второй основной путь—окисление в метилмалонат с последующим образованием метилмалонил-CoA и изомеризацией последнего в сукцинил-CoA (реакции 8V—10V, рис. 31.28). Изомеризация (реакция 10V, рис. 31.28) протекает при участии аденозилкобаламинового кофермента, она катализируется метилмалонил-CoA-мутазой. Эта реакция важна для катаболизма не только валина, но и пропионил-CoA-катаболита изолейцина (рис. 31.29). В условиях дефицита кобаламина (витамина B_{12}) активность мутазы снижается; у жвачных, использующих в качестве источника энергии пропионат, образующийся при брожении в рубце, при этом наблюдается «пищевой метаболический дефект». Очищенная мутаза из печени овцы содержит 2 молекулы дезоксиаденозилвитамина B_{12} на молекулу фермента. Преобразование в сукцинил-CoA происходит путем внутримолекулярного переноса связанной с CoA карбоксильной группы. Хотя полная реакция напоминает изомеризацию трео-β-метиласпартата в глутамат, механизмы этих реакций, вероятно, различаются.

Реакции, специфичные для катаболизма изолейцина (рис. 31.29)

Подобно тому как это было в случае валина и лейцина, первые сведения о катаболизме изолейцина были получены в ходе наблюдений над животными, которые содержались на различных рационах; в результате были выявлены гликогенные и слабокетогенные свойства изолейцина. Возможность синтеза гликогена из изолейцина была подтверждена при использовании D_2O. С помощью ^{14}C-меченных со-

единений показано, что углеродный скелет изолейцина расщепляется с образованием ацетил-СоА и пропионил-СоА (рис. 31.29).

Реакция 4I: гидратация тиглил-СоА. Эта реакция протекает аналогично реакции катаболизма валина (реакция 4V, рис. 31.28). Она катализируется кротоназой тканей млекопитающих.

Метакрилил-СоА → (4V, H_2O) → β-Гидроксиизобутирил-СоА → (5V, H_2O, CoA·SH) → β-Гидроксиизобутират → (6V, NAD^+ → $NADH + H^+$) → Метилмалоновый полуальдегид → (8V, H_2O, NAD^+ → $NADH + H^+$) → Метилмалонат; Метилмалоновый полуальдегид ⇄ (7V, α-АК, α-КК) β-Аминоизобутират; Метилмалонат → (9V, CoA·SH, MgATP, H_2O) → Метилмалонил-СоА → (10V, Кофермент B_{12}) → Сукцинил-СоА

Рис. 31.28. Катаболизм метакрилил-СоА, образующегося из L-валина (см. рис. 31.26). α-КК — α-кетокислота, α-АК — α-аминокислота.

Реакция 5I: дегидрогенирование α-метил-β-гидроксибутирил-СоА. Реакция аналогична реакции 5V катаболизма валина (рис. 31.28). Напомним, что в ходе катаболизма валина соответствующий ацил-СоА сначала гидролизуется и лишь затем окисляется.

Реакция 6I: тиолиз α-метилацетоацетил-СоА. Тиолитический разрыв ковалентной связи между углеродными атомами 2 и 3 в молекуле α-метилацетоацетил-СоА катализируется β-кетотиолазой подобно тиолизу ацетоацетил-СоА с образованием двух молекул ацетил-СоА. Природа образующихся продуктов, ацетил-СоА (кетогенный) и пропионил-СоА (гликогенный), позволяет понять кетогенные и гликогенные свойства изолейцина.

Метаболические нарушения катаболизма разветвленных аминокислот (лейцина, валина и изолейцина)

Известны четыре метаболических нарушения. Наиболее обстоятельно изучена болезнь «кленового сиропа» (названная по характерному запаху мочи больных). Описано более 50 случаев заболевания. Частота его оценивается в 5—10 случаев на миллион новорожденных. Остальные три болезни — гипер-

Тиглил-СоА → (4I, H_2O) → α-Метил-β-гидроксибутирил-СоА → (5I, [2H]) → α-Метилацетоацетил-СоА → (6I, CoA·SH) → Ацетил-СоА + Пропионил-СоА

Рис. 31.29. Катаболизм тиглил-СоА, образующегося из L-изолейцина (см. рис. 31.26).

валинемия, скачкообразная кетонурия (повышение содержания в моче кетокислот с разветвленной цепью) и изовалериановая ацидемия — наблюдались менее чем у пяти детей каждая.

А. Гипервалинемия. Это метаболическое заболевание характеризуется повышенным содержанием в плазме валина (но не лейцина или изолейцина), что обусловлено нарушением переаминирования валина с образованием α-кетоизовалерата (реакция 1, рис. 31.26). При этом переаминирование лейцина и изолейцина (реакция 1, рис. 31.26) не нарушается.

Б. Болезнь «кленового сиропа». Наиболее ярким отличительным признаком этой наследственной болезни является характерный запах мочи больного, напоминающий запах кленового сиропа или жженого сахара. В плазме и в моче сильно повышается содержание аминокислот с разветвленной цепью — лейцина, изолейцина и валина, а также соответствующих им α-кетокислот. Поэтому болезнь «кленового сиропа» иногда называют **кетонурией разветвленных кетокислот**. Отмечено также присутствие в моче разветвленных α-гидроксикислот, образующихся при восстановлении α-кетокислот.

Характерные признаки болезни проявляются в конце первой недели после рождения. Наряду с описанными выше биохимическими нарушениями возникают трудности при кормлении ребенка, может наблюдаться рвота. Иногда наблюдается летаргия. Диагноз ранее конца первой недели возможен только с помощью ферментного анализа. У выживших детей отмечены выраженные нарушения мозговой деятельности. При отсутствии лечения летальный исход наступает к концу первого года жизни.

Биохимической причиной болезни является отсутствие или сильное снижение активности **декарбоксилазы α-кетокислот**, катализирующей превращение всех трех разветвленных α-кетокислот в ацил-CoA-тиоэфиры с выделением CO_2 (реакция 2, рис. 31.26). Это было установлено путем ферментного анализа лейкоцитов и клеток культуры фибробластов кожи больных детей. Механизм токсического действия накапливающихся соединений неизвестен.

Больным назначают диету с заменой белков на смесь очищенных аминокислот, не содержащую лейцина, изолейцина и валина. После того как содержание этих трех аминокислот в плазме снизится до нормального уровня, можно вводить их в пищу, например, в составе молока и других продуктов, но лишь в таком количестве, чтобы обеспечить (но не превысить) потребности в аминокислотах с разветвленной цепью. Нет сведений о том, можно ли впоследствии ослабить ограничения в диете и когда именно. Если лечение было начато в первую неделю жизни ребенка, удается значительно смягчить тяжелые проявления болезни.

В. Скачкообразная кетонурия (разветвленных кетокислот). Эта болезнь является одной из форм болезни «кленового сиропа» и, вероятно, связана со сравнительно меньшими структурными изменениями **декарбоксилазы α-кетокислот**. Активность декарбоксилазы в лейкоцитах и фибробластах значительно ниже нормы, но все же существенно выше, чем в классических случаях болезни «кленового сиропа». Поскольку в этом случае больные обладают хотя и сниженной, но все же определенной способностью к катаболизму лейцина, изолейцина и валина, типичные симптомы болезни «кленового сиропа» проявляются позднее и наблюдаются лишь эпизодически. Прогноз при назначении соответствующей диеты более благоприятный.

Болезнь «кленового сиропа» и скачкообразная кетонурия разветвленных кетокислот могут служить иллюстрацией положения, о котором говорилось во введении к этой главе,— о мутациях, вызывающих различные изменения в структуре одного и того же фермента. Вероятно, изменения активности фермента проявляются в спектре форм заболевания, включающем выраженную форму, скачкообразную кетонурию и практически нормальное состояние.

Г. Изовалериановая ацидемия. Симптомами заболевания являются запах сыра у выдыхаемого воздуха и жидкостей организма, рвота, ацидоз и даже кома; последняя может возникнуть при избыточном потреблении белка или как следствие присоединившегося инфекционного заболевания. В трех известных случаях наблюдалась умеренная задержка умственного развития. Причиной болезни является недостаточность **изовалерил-CoA-дегидрогеназы** (реакция 3, рис. 31.26). Накапливающийся в результате изовалерил-CoA гидролизуется, образующийся изовалерат выделяется в составе мочи и пота.

Дополнительные метаболические нарушения, связанные с катаболизмом аминокислот (пропионат, метилмалонат и витамин B_{12})

Пропионил-CoA (рис. 31.21) может образоваться из изолейцина (рис. 31.26 и 31.29), метионина (рис. 31.23), а также из боковой цепи холестерола и жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Превращение пропионил-CoA в амфиболические интермедиаты включает биотинзависимое карбоксилирование с образованием метилмалонил-CoA; последний может образоваться и непосредственно из валина (при этом не происходит предварительного образования пропионил-CoA) (рис. 31.21 и 31.28, реакция 9 V). В результате изомеризации, коферментом которой является производное витамина B_{12}, метилмалонил-CoA превращается в сукцинил-CoA — интермедиат цикла лимонной кислоты, который окисляется до CO_2 и воды.

Вскоре после того, как было установлено участие 5′-дезоксиаденозилкобаламина в качестве кофактора

изомеризации метилмалонил-CoA в сукцинил-CoA, было показано, что пациенты с недостаточностью витамина B_{12} экскретируют с мочой большие количества метилмалоната. Метилмалоновая ацидурия прекращалась после введения достаточных количеств витамина B_{12}.

А. Пропионовая ацидемия. Недостаточная активность пропионил-CoA-карбоксилазы характеризуется высоким содержанием пропионата в сыворотке и нарушением катаболизма пропионата в лейкоцитах. Лечение состоит в назначении бедной диеты и в принятии мер по снижению метаболического ацидоза.

Б. Метилмалоновая ацидурия. Известны две формы метилмалоновой ацидурии. Одна из них прекращается после парентерального введения физиологических доз витамин B_{12}, а другая — нет. В последнем случае улучшение наступает после введения больших (фармакологических) доз витамина B_{12} (1 г в сутки). Фибробласты больных, культивируемые в среде, содержащей витамин B_{12} (концентрация 25 пг·мл$^{-1}$), слабо окисляют [^{14}C]-пропионат. Содержание 5'-дезоксиаденозилкобаламина в клетках культуры составляло только около 10% от его содержания в контрольных клетках. После повышения концентрации витамина B_{12} в среде в 10 000 раз скорость окисления пропионата и внутриклеточная концентрация 5'-дезоксиаденозилкобаламина приблизились к норме. В то же время не наблюдалось отклонений в связывании кофермента с апоферментом мутазы. Таким образом, причиной второй формы метилмалоновой ацидурии, по-видимому, является неспособность к образованию 5'-дезоксиаденозилкобаламина при нормальных концентрациях витамина.

Приведенные выше примеры наследственных нарушений катаболизма аминокислот относятся к сравнительно хорошо изученным заболеваниям. По этой теме имеется более обстоятельный обзор (Wellner and Meister, 1981).

ЛИТЕРАТУРА

Bremer H. J. et al. Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis, Urban and Schwarzenberg, 1981.

Cooper A. J. L. Biochemistry of the sulfur-containing amino acids, Annu. Rev. Biochem., 1983, **52**, 187.

Felig P. Amino acid metabolism in man, Annu. Rev. Biochem., 1975, **44**, 933.

Frimter G. W. Aminoacidurias due to disorders of metabolism. (2 parts), N. Engl. J. Med., 1973, 289, **835**, 895.

Paxton R., Harris R. A. Isolation of rabbit liver branched chain α-ketoacid dehydrogenase and regulation by phosphorylation, J. Biol. Chem., 1982, **257**, 14433.

Paxton R., Harris R. A. Regulation of branched-chain α-ketoacid dehydrogenase kinase, Arch. Biochem Biophys, 1984, **231**, 48.

Rosenberg L. E., Scriver C. R. Disorders of amino acid metabolism, Chapter 11. In: Metabolic Control and Disease, Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds), Saunders, 1980.

Schwarz V. A Clinical Companion to Biochemical Studies, Freeman, 1978.

Stanbury J. B. et al. (eds), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., McGraw-Hill, 1983.

Wellner D., Meister A. A survey of inborn errors of amino acid metabolism and transport in man, Annu. Rev. Biochem., 1981, **50**, 911.

Глава 32

Превращение аминокислот в специализированные продукты

Виктор Родуэлл

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты являются основным источником азота для животных и служат предшественниками ряда других азотистых соединений. Поскольку большинство этих соединений уже не являются аминокислотами, процессы их образования протекают по метаболическим путям, которые рассматриваются в других разделах книги. К числу физиологически важных продуктов, образующихся из аминокислот, относятся гем, пурины, пиримидины, гормоны и нейромедиаторы, в частности, биологически активные пептиды. Кроме того, многие белки содержат аминокислоты, модифицированные для выполнения определенной функции, например для связывания кальция, для образования поперечных сшивок; в этом случае исходные аминокислотные остатки в соответствующих белках являются предшественниками модифицированных аминокислот. Наконец, имеются небольшие пептиды или пептидоподобные молекулы, синтез которых идет без участия рибосом, выполняющие в клетках специфические функции.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

К специфическим соединениям, синтезируемым из аминокислот и представляющим большой интерес для медицины, относится гистамин. Он представляет собой биологически активный амин, образующийся путем декарбоксилирования гистидина, и играет центральную роль во многих аллергических реакциях у человека. К образующимся из аминокислот специфическим нейромедиаторам относятся γ-аминобутират (предшественник — глутамат); 5-гидрокситриптамин (серотонин, предшественник — триптофан), а также дофамин, норадреналин и адреналин (предшественник — тирозин). Для понимания принципов функционирования мозга необходимы, в частности, более детальные сведения о действии нейромедиаторов. Следует также иметь в виду, что многие лекарственные препараты, используемые для лечения неврологических и психических заболеваний, влияют на метаболизм указанных нейромедиаторов.

ГЛИЦИН

Синтез гема

Атомы α-углерода и азота глицина используются для синтеза порфиринового кольца гемоглобина (см. гл. 33). Источником азота пиррольного кольца является азот глицина, а источником соседнего углерода — α-углерод глицина. α-Углерод последнего служит также источником атомов метиленовых мостиков между пиррольными кольцами.

В **«сукцинат-глициновом цикле»** (рис. 32.1) сукцинил-СоА конденсируется с атомом α-углерода глицина, образуя α-амино-β-кетоадипат. Сукцинил-СоА поступает из цикла лимонной кислоты. α-Амино-β-кетоадипат декарбоксилируется и превращается в δ-аминолевулинат — предшественник порфирина; он превращается также в сукцинат и α-кетоглутарат (α-КГ), которые возвращаются в цикл лимонной кислоты.

Нарушения метаболизма гема будут обсуждаться в гл. 33.

Синтез пуринов

Молекула глицина целиком используется для синтеза пуринов, поставляя атомы углерода в положения 4, 5 и 7 пуринового остова (см. гл. 35).

Образование глициновых конъюгатов

При конъюгировании глицина с холевой кислотой образуется гликохолевая кислота. С бензоатом глицин образует гиппурат (рис. 32.2). Количественная оценка способности печени превращать бензоат в гиппурат использовалась ранее в качестве теста на функцию печени.

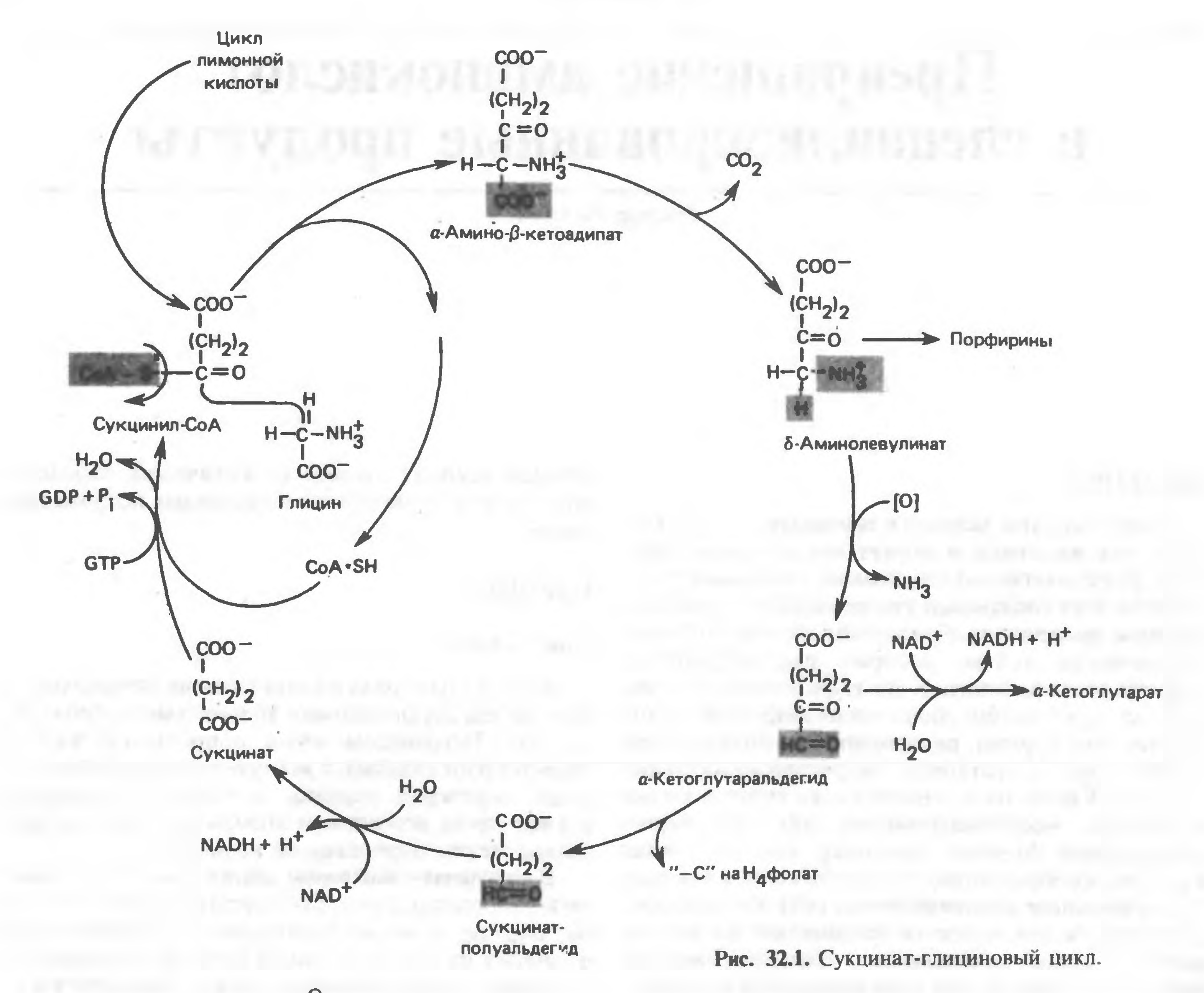


Рис. 32.1. Сукцинат-глициновый цикл.

Бензоат
Mg-ATP
CoA·SH
$Mg\text{-}ADP + P_i$
Бензоил-CoA
Глицин
CoA·SH
Гиппурат

Рис. 32.2. Биосинтез гиппурата.

Синтез креатина

Саркозиновый компонент креатина (N-метилглицин) образуется в результате реакции глицина с S-аденозилметионином.

α-АЛАНИН

На долю аланина и глицина приходится значительная часть аминного азота в плазме человека. Аланин является главным компонентом клеточных стенок бактерий, частично в виде D-изомера; содержание последнего составляет 39—50% у *Streptococcus faecalis* и 67% у *Staphylococcus aureus*.

β-АЛАНИН

Свободного β-аланина в тканях мало; значительно большее количество его находится в составе β-аланилдепептидов (см. ниже) и кофермента А (см. рис. 17.6).

Биосинтез

В микроорганизмах β-аланин образуется путем α-декарбоксилирования аспартата; в тканях млекопитающих он в основном является продуктом катаболизма урацила (см. рис. 35.17), карнозина и ансерина (рис. 32.3).

Катаболизм

Катаболизм β-аланина в тканях млекопитающих включает его переаминирование с образованием малонат-полуальдегида, который далее окисляется до ацетата, а затем до CO_2.

Гипер -β-аланинемия

Это редкое метаболическое нарушение характеризуется повышенным содержанием свободного β-аланина в плазме, спинномозговой жидкости и в моче, а также в тканях мозга, почек, печени и в скелетной мышце. Повышается также содержание таурина и β-аминоизобутирата.

β-АЛАНИНОВЫЕ ДИПЕПТИДЫ

Основная часть β-аланина в организме человека находится в скелетных мышцах в составе дипептида карнозина (рис. 32.3). Сходный по строению β-аланиновый дипептид ансерин (N-метилкарнозин или β-аланил-1-метил- L-гистидин, рис. 32.3) в мышцах человека отсутствует, но имеется в скелетных мышцах тех видов, у которых мышцы способны к быстрым сокращениям (мышцы конечностей кролика, грудная мышца птиц). Таким образом, ансерин может выполнять функции, отличные от функций карнозина.

Физиологические функции β-аланил-имидазольных дипептидов не вполне ясны. Возможно, они выполняют буферные функции и поддерживают pH в скелетной мышце, сокращающейся в анаэробных условиях. Карнозин и ансерин стимулируют ATP-азную активность миозина in vitro. Оба дипептида образуют хелатные комплексы с медью и способствуют поглощению этого металла. Они, следовательно, могут участвовать в патологическом процессе при болезни Вильсона (см. гл. 7).

Биосинтез

Карнозин образуется из β-аланина и L-гистидина в результате реакции с участием ATP, катализируемой карнозинсинтетазой:

ATP + L-Гистидин + β-Аланин → AMP + PP_i + Карнозин.

Ансерин образуется из карнозина (донором метильной группы служит S-аденозилметионин) в результате реакции, катализируемой N-метилтрансферазой:

S-Аденозилметионин + Карнозин →
S-Аденозилгомоцистеин + Ансерин.

В процессе реакции образуется связанный с ферментом β-аланиладенилат.

SH
$\overset{+}{N}(CH_3)_3$
N NH$_2^+$ CH O⁻ CH$_2$ C O

Эрготионеим

O C CH$_2$ CH$_2$ NH$_3^+$
N NH$_2^+$ NH CH O⁻ CH$_2$ C O

Карнозин

O C CH$_2$ CH$_2$ NH$_3^+$
N N CH$_3$ NH H CH O⁻ CH$_2$ C O

Ансерин

O C CH$_2$ CH$_2$ CH$_2$ NH$_3^+$
N NH$_2^+$ NH CH O⁻ CH$_2$ C O

Гомокарнозин

Рис. 32.3. Соединения, родственные гистидину. В прямоугольник заключены фрагменты, образовавшиеся не из гистидина.

(На рисунке опечатка: следует читать не «эрготионеим», а «эрготионеин».)

Абсорбция β-аланиновых дипептидов

В ткань почек и энтероциты кишечника карнозин и β-аланин поступают при участии мембранных переносчиков, которые отличают один субстрат от другого и оба субстрата от других дипептидов. Способность переносчиков отличать β-аланин от карнозина используется при диагностике болезни Хартнупа — наследственного нарушения транспорта некоторых нейтральных α-аминокислот (см. гл. 31). У пациентов с болезнью Хартнупа содержание в крови гистидина соответствует норме после приема с пищей карнозина, но оказывается ниже нормы после приема L-гистидина

Катаболизм

Карнозин гидролизуется с образованием β-аланина и L-гистидина содержащимся в сыворотке цинксодержащим металлоферментом карнозиназой (карнозин-гидролазой). В сыворотке имеются две формы карнозиназы.

Гомокарнозин

Гомокарнозин (γ-аминобутирил-L-гистидин, рис. 32.3) — дипептид центральной нервной системы, структурно и метаболически родственный карнозину; его физиологическая функция пока не ясна. Этот дипептид, образованный γ-аминобутиратом и L-гистидином, находится в ткани мозга человека; концентрация его в разных отделах мозга различна. Биосинтез гомокарнозина в мозгу человека катализируется, по-видимому, карнозинсинтетазой. Сывороточная карнозиназа гомокарнозин не гидролизует.

Недостаточность сывороточной карнозиназы

Это наследуемое, предположительно аутосомно-рецессивное заболевание характеризуется стойкой карнозинурией и периодической карнозинемией. Карнозинурия не прекращается даже при исключении карнозина из диеты.

Гомокарнозиноз

При этом состоянии содержание гомокарнозина повышается в ткани мозга и в спинномозговой жидкости, но не в плазме и моче. Описан один случай заболевания.

СЕРИН

Большая часть серина в фосфопротеинах находится в форме O-фосфосерина.

Серин участвует в синтезе сфингозина (см. гл. 25). Он участвует также в синтезе пуринов и пиримидинов. β-Углерод является источником метильных групп тимина (и холина) и атомов углерода в положениях 2 и 8 пуринового ядра (см. гл. 35).

ТРЕОНИН

Треонин в реакциях переаминирования не участвует; его D-изомер и соответствующая α-кетокислота млекопитающими не усваиваются. В ряде белков треонин находится в форме O-фосфотреонина.

МЕТИОНИН

Метионин как донор метильной группы уже рассматривался в гл. 31. В форме S-аденозилметионина он является главным истонником метильных групп в организме. Метильные группы могут использоваться как непосредственно, так и в окисленном виде. Метильный углерод может переходить в состав одноуглеродного фрагмента, который конъюгируется с глицином при синтезе серина. В форме S-аденозилметионина метионин служит предшественником 1,3-диаминопропанового фрагмента полиаминов, спермина и спермидина (см. ниже раздел «Орнитин» и рис. 32.6).

ЦИСТЕИН

Содержащийся в моче сульфат практически полностью образуется при окислении L-цистеина. Сера метионина (после образования гомоцистеина) переносится на серин (см. рис. 29.10) и участвует в образовании сульфата мочи опосредованно (т. е. после образования цистеина). L-Цистеин является предшественником тиоэтаноламинового фрагмента кофермента A. Он является также предшественником таурина, образующего конъюгаты с желчными кислотами с образованием таурохолевой кислоты и других продуктов.

ГИСТИДИН

Гистамин образуется из гистидина путем декарбоксилирования; в тканях млекопитающих эта реакция катализируется **декарбоксилазой ароматических L-аминокислот**. Этот фермент катализирует также декарбоксилирование ДОФА, 5-гидрокситриптофана, фенилаланина, тирозина и триптофана (см. ниже). Декарбоксилаза in vitro и in vivo ингибируется α-метиламинокислотами, которые применяются в клинике в качестве гипотензивных средств. Наряду с декарбоксилазой ароматических аминокислот в большинстве клеток имеется гистидиндекарбоксилаза, катализирующая декарбоксилирование гистидина.

К числу находящихся в организме гистидин-

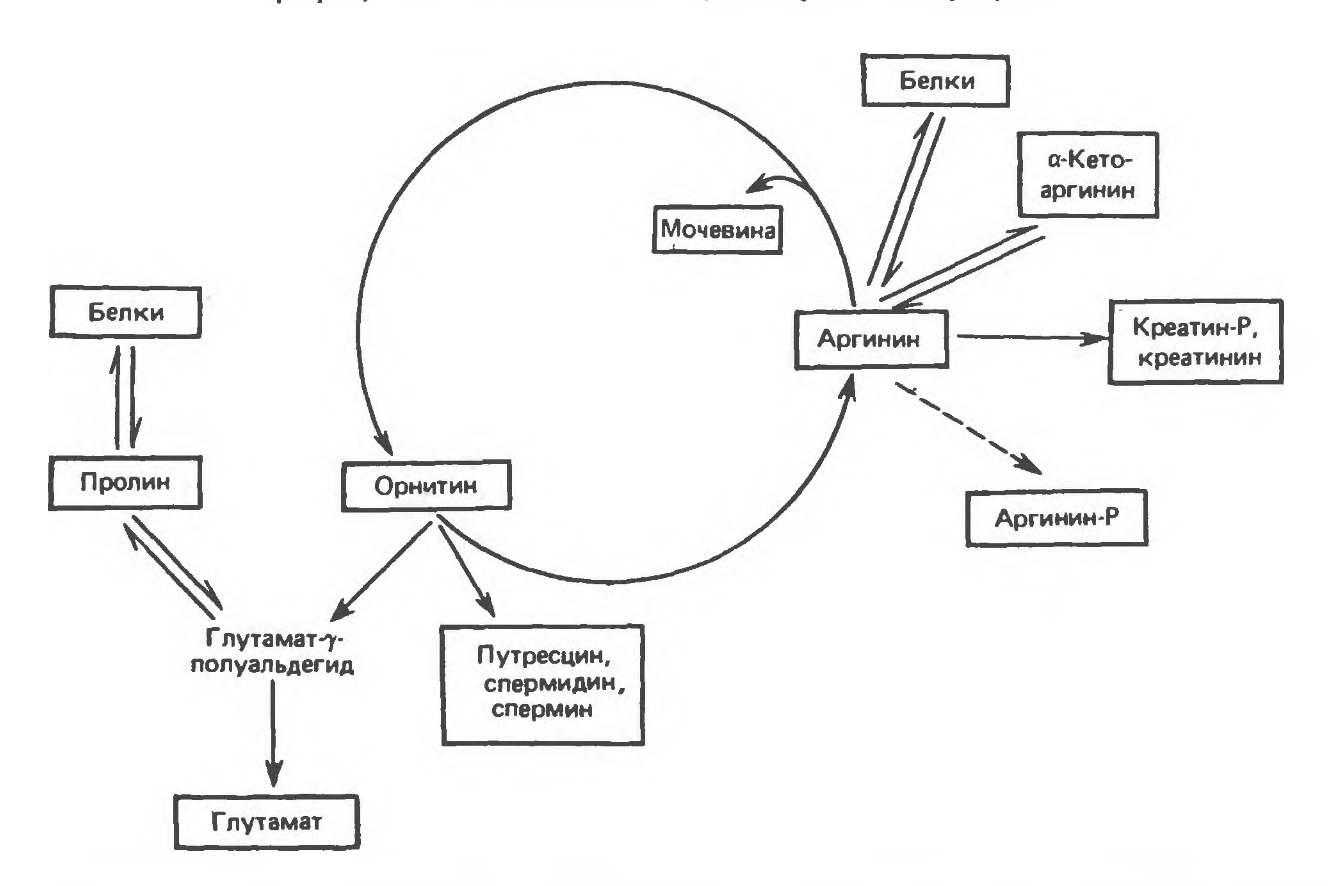


Рис. 32.4. Метаболизм аргинина, орнитина и пролина. Сплошными стрелками показаны реакции, протекающие в тканях млекопитающих. Синтез путресцина и спермина происходит у млекопитающих и у бактерий. Аргининфосфат находится в мышцах беспозвоночных, где он функционирует как фосфаген подобно креатинфосфату в тканях млекопитающих.

содержащих соединений относятся **эрготионеин** (в эритроцитах и печени), карнозин и ансерин (рис. 32.3). 1-Метилгистидин, обнаруживаемый в моче человека, вероятно, образуется из ансерина. Содержание 3-метилгистидина в моче человека обычно составляет около 50 мг/100 мл, у пациентов с болезнью Вильсона оно значительно ниже.

АРГИНИН

Аргинин служит донором формамидиновой группы при синтезе креатина у приматов (рис. 32.11) и синтезе стрептомицина у актиномицетов *Streptomyces*. Другие пути использования аргинина включают превращение в орнитин и далее в путресцин, спермин и спермидин (рис. 32.4), а также синтез аргининфосфата (функционального аналога креатинфосфата) в мышцах безпозвоночных.

ОРНИТИН

Помимо его роли в биосинтезе мочевины (см. гл. 30) орнитин (вместе с метионином) служит предшественником широко распространенных у млекопитающих (и бактерий) полиаминов спермина и спермидина (рис. 32.5). В организме здорового человека синтезируется приблизительно 0,5 ммоль спермина в день. Фармакологические дозы полиаминов вызывают понижение температуры и снижение кровяного давления.

Спермидин и спермин участвуют в различных физиологических процессах, общим признаком которых является связь с процессами пролиферации и роста клеток. Они являются факторами роста для культур клеток млекопитающих и бактерий и играют определенную роль в стабилизации интактных клеток, субклеточных органелл и мембран. Благодаря тому что молекулы полиаминов несут большое число положительных зарядов, они легко ассоциируют с полианионами, такими, как ДНК и РНК, и участвуют в таких фундаментальных процессах, как стимуляция биосинтеза ДНК и РНК, стабилизация ДНК и упаковка ДНК в бактериофагах. Полиамины оказывают влияние на синтез белка и являются ингибиторами ряда ферментов, включая протеинкиназы.

Хотя в настоящее время не удается описать механизм действия полиаминов на специфические метаболические процессы, их важная роль в метаболизме млекопитающих убедительно показана в экспериментах приводимого ниже типа. Начальная реакция биосинтеза полиаминов катализируется орнитиндекарбоксилазой (рис. 32.6). Добавление в культуру клеток млекопитающих ингибиторов орнитиндекарбоксилазы (например, α-метилорнитина или дифторметилорнитина) вызывает усиление синтеза орнитиндекарбоксилазы. Это свидетельствует о важной физиологической роли данного фермента, единственной известной функцией которого является биосинтез полиаминов.

$^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^{+}$

1,3-Диаминопропан (А)

$^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^{+}$

1,4-Диаминобутан (Б) (путресцин)

$^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^{+}$

1,5-Диаминопентан (кадаверин)

А, Б

$^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^{+}$

Спермидин

А, Б, А

$^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^{+}$

Спермин

Рис. 32.5. Структура природных полиаминов. Обратите внимание, что спермидин и спермин являются полимерами диаминопропана (А) и диаминобутана (Б). В тканях млекопитающих присутствует также диаминопентан (кадаверин).

Биосинтез полиаминов

На рис. 32.6 представлен метаболический путь биосинтеза полиаминов в тканях млекопитающих. Обратите внимание на то, что путресциновый фрагмент спермидина и спермина образуется из L-орнитина (интермедиата цикла мочевины, см. гл. 30), а диаминопропановый фрагмент — из L-метионина (с промежуточным образованием S-аденозилметионина). Орнитиндекарбоксилаза и S-аденозилметионин-декарбоксилаза являются индуцируемыми ферментами с коротким периодом полужизни. Спермин- и спермидинсинтаза, напротив, не являются индуцируемыми и относительно «стабильны».

Из числа ферментов биосинтеза полиаминов у млекопитающих орнитиндекарбоксилаза и S-аденозилметионин-декарбоксилаза представляют интерес в плане их регуляции и возможности направленной химиотерапии. Время полужизни орнитиндекарбоксилазы (приблизительно 10 мин) меньше, чем у любого другого известного фермента млекопитающих; активность этого фермента очень быстро и масштабно изменяется в ответ на различные стимулирующие воздействия. Добавление в культуру клеток млекопитающих гормона роста, кортикостероидов, тестостерона или фактора роста эпидермиса быстро повышает активность орнитиндекарбоксилазы в 10—200 раз. При добавлении в культуру клеток полиаминов индуцируется синтез белкового антифермента (антизима), который связывается с орнитиндекарбоксилазой и ингибирует ее активность. Таким образом, активность орнитиндекарбоксилазы контролируется белок-белковым взаимодействием подобно регуляции активности трипсина ингибиторами белковой природы. По отношению к орнитиндекарбоксилазе дифторметилорнитин можно рассматривать как «суицидальный ингибитор», т. е. соединение, превращающееся в ингибитор под действием самого фермента. Он используется для выделения штамма мутантных клеток, характеризующихся гиперпродукцией орнитиндекарбоксилазы, а также как ингибитор репликации клеток (он действует как химиотерапевтический фактор, мишенью которого является фермент).

S-аденозилметионин-декарбоксилаза является единственным известным эукариотическим ферментом, содержащим пируват как ковалентно связанный кофактор (обычно декарбоксилазы содержат пиридоксальфосфат, но в S-аденозилметионин-декарбоксилазе он отсутствует). S-Аденозилметионин-декарбоксилаза имеет сравнительно небольшой период полужизни (1—2 ч) и реагирует на действие стимуляторов клеточного роста подобно орнитиндекарбоксилазе, однако несколько медленнее и менее масштабно. Активность S-аденозилметионин-декарбоксилазы (рис. 32.6) ингибируется декарбоксилированным S-аденозилметионином и стимулируется путресцином.

Катаболизм полиаминов

На рис. 32.7 представлена схема катаболизма полиаминов в тканях млекопитающих. Фермент полиаминоксидаза, находящийся в пероксисомах печени, окисляет спермин в спермидин и далее спермидин в путресцин. Оба диаминопропановых фрагмента превращаются в β-аминопропионовый альдегид. Часть образующегося путресцина окисляется с образованием NH_4^+ и CO_2, механизм этого процесса еще не выяснен. Основная часть путресцина и спермидина выделяется с мочой в виде конъюгатов, главным образом в форме ацетильных производных.

ТРИПТОФАН

Серотонин

Вторичный путь метаболизма триптофана включает его гидроксилирование до 5-гидрокситриптофана. Окисление триптофана путем гидроксилирования аналогично превращению фени-

Метионин + Mg-ATP
Mg-PP$_i$ + P$_i$
S-Аденозилметионин
S-Аденозилметионин-декарбоксилаза
CO_2
Декарбоксилированный S-аденозилметионин
Метилтиоаденозин
L-Орнитин
Орнитин-декарбоксилаза
CO_2
Путресцин
Спермидин-синтаза
Спермидин
Декарбоксилированный S-аденозилметионин
Спермин-синтаза
Метилтиоаденозин
Спермин

Рис. 32.6. Интермедиаты и ферменты, участвующие в биосинтезе спермидина и спермина. Чтобы не загромождать рисунок, метиленовые группы не приведены.

^+H_3N—Спермин ($^+H_3N\sim\sim N^+H_2\sim\sim N^+H_2\sim NH_3^+$)

Спермин

Полиамин-оксидаза; O_2; H_2O_2; β-Аминопропиональдегид (NH_3^+)

$H_3N\sim N^+H_2\sim NH_3^+$

Спермидин

Полиамин-оксидаза; O_2; H_2O_2; β-Аминопропиональдегид

$^+H_3N\sim\sim NH_3^+$

Путресцин

$NH_4^+ + CO_2$

Рис. 32.7. Катаболизм полиаминов. Для наглядности структуры приведены в схематизированном виде

лаланина в тирозин (рис. 29.11), причем печеночная фенилаланингидроксилаза катализирует также и гидроксилирование триптофана. При декарбоксилировании 5-гидрокситриптофана образуется **5-гидрокситриптамин (серотонин)** (рис. 32.8, реакция 1) — мощный сосудосуживающий агент и стимулятор сокращения гладких мышц.

5-Гидрокситриптофан-декарбоксилаза, образующая серотонин из гидрокситриптофана, находится в почках (свинья, морская свинка), печени и желудке. Однако декарбоксилирование 5-гидрокситриптофана может осуществляться и более широко распространенной декарбоксилазой ароматических L-аминокислот.

Большая часть серотонина подвергается окислительному дезаминированию с образованием 5-гидроксииндолацетата. Ферментом, катализирующим эту реакцию, является **моноаминоксидаза** (рис. 32.8, реакция 2). К числу ингибиторов этого фермента относится ипрониазид. Предполагают, что психическая стимуляция, наступающая после приема этого лекарства, обусловлена его способностью пролонгировать действие серотонина благодаря ингибированию моноаминоксидазы. В моче здорового человека в составе суточной порции экскретируется 2—8 мг 5-гидроксииндолацетата.

Образование серотонина значительно увеличивается при злокачественном карциноиде (аргентаффиноме). Это заболевание характеризуется распространением серотонин-образующих опухолевых клеток в аргентаффинной ткани брюшной полости. При карциноиде наблюдается нарушение метаболизма триптофана, в результате которого значительно бо́льшая, чем в норме, доля триптофана метаболизирует по пути образования гидроксииндола. В норме в серотонин превращается лишь 1% триптофана, а у пациентов с карциноидом 60%. Такое отклонение метаболизма от основного пути значительно снижает образование из триптофана никотиновой кислоты; в результате могут наблюдаться симптомы пеллагры, а также отрицательный азотистый баланс. Другими метаболитами серотонина, идентифицированными в моче больных карциноидом, являются 5-гидроксииндолацетурат (конъюгат глицина и 5-гидроксииндолацетата) и конъюгат N-ацетилсеротонина с глюкуроновой кислотой.

Мелатонин

Мелатонин образуется из серотонина путем N-ацетилирования (рис. 32.8, реакция 3) и последующего метилирования 5-гидроксильной группы (рис. 32.8, реакция 4). Метилирование происходит в ткани шишковидной железы. Наряду с метилированием N-ацетилсеротонина происходит также прямое метилирование серотонина (рис. 32.8, реакция 5) и его метаболита 5-гидроксииндолацетата (рис. 32.8, реакция 6).

Серотонин и 5-метокситриптамин окисляются в соответствующие кислоты моноаминоксидазой. Циркулирующий мелатонин захватывается всеми тканями, включая мозг, однако быстро подвергается гидроксилированию по положению 6 и затем конъюгирует с сульфатом (70%) и глюкуроновой кислотой (6%); часть его превращается в продукты неиндольной природы.

Индольные производные в моче

Триптофан может превращаться в различные индольные производные (рис. 32.8). Конечными продуктами этих превращений, экскретируемыми с мочой, являются в основном 5-гидроксииндолацетат, главный продукт гидрокситриптофан-серотонинового пути, и индол-3-ацетат, образующийся путем декарбоксилирования и окисления индолпирувата — кетокислоты, соответствующей триптофану.

Почки и печень млекопитающих, а также бактерии фекалий человека декарбоксилируют триптофан с образованием триптамина, который затем окисляется в индол-3-ацетат. Больные фенилкетонурией экскретируют с мочой повышенные количества ин-

5-Гидрокситриптофан

① CO_2

5-Гидрокситриптамин (серотонин)

МАО ② O_2 $[NH_4^+]$

③ Ацетил-CoA CoA•SH

⑤ $-CH_3$

5-Гидроксииндол-3-ацетат

Выделяется в форме конъюгатов

5-Метокситриптамин

N-Ацетилсеротонин

⑥ $-CH_3$

O_2 МАО $[NH_4^+]$

5-Метоксииндол-3-ацетат

④ $-CH_3$

5-Метоксииндол-3-ацетат

Выделяется в форме конъюгатов

Мелатонин (N-ацетил-5-метоксисеротонин)

Выделяется в форме конъюгатов

Рис. 32.8. Биосинтез и метаболизм мелатонина. $[NH_4^+]$ — переаминирование; МАО — моноаминоксидаза. В тексте приведены ссылки на номера реакций.

долацетата (а также индоллактата, образующегося в результате восстановления индолпирувата).

МЕЛАНИНЫ

Эумеланины представляют собой нерастворимые гетерогенные высокомолекулярные гетерополимеры (черного или коричневого цвета) 5,6-дигидроксииндола и некоторых его биосинтетических предшественников. **Феомеланины** — это желтые или красновато-коричневые полимеры с высокой молекулярной массой, однако растворимые в разбавленных щелочах. Низкомолекулярные **трихохромы** близки к феомеланинам (оба вида соединений образуются из цистеина и допахинона). Феомеланины и трихохромы в основном находятся в составе волос и перьев.

Биосинтез меланинов

Обсуждение биосинтеза меланинов осложняется его многоступенчатым и разветвленным характером, обрывом путей биосинтеза, сложным химическим строением меланиновых гетерополимеров и их нерастворимостью. Эти же факторы затрудняют определение их структуры. Меланины синтезируются в **меланосомах** — частицах, связанных с мембраной и находящихся в меланоцитах — клетках, образующихся в эмбриогенезе из нервного валика. Растущий полимер эумеланина, как полагают, может улавливать свободные радикалы; он может также частично деградировать под действием H_2O_2, образующейся в ходе автоокислительных процессов. Феомеланины и эумеланины вступают в комплексы с белками меланосомного матрикса, образуя меланопротеин.

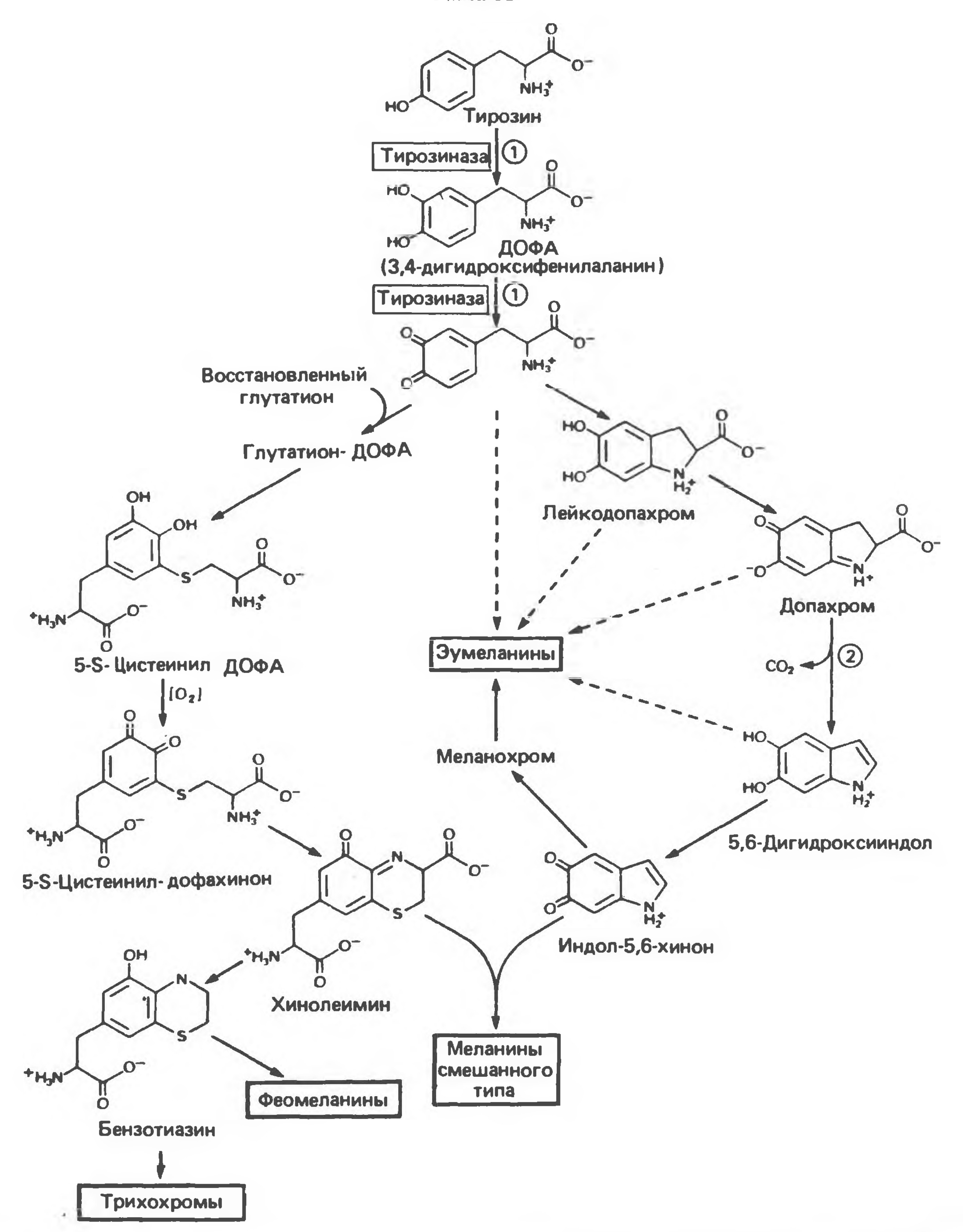


Рис. 32.9. Известные интермедиаты и реакции биосинтеза эумеланинов и феомеланинов. Полимеры меланина содержат одновременно эумеланин и феомеланин в различных пропорциях. Пунктирные стрелки идут от соединений, участвующих в синтезе эумеланинов. Цифры в кружочках указывают вероятные места регуляции процесса биосинтеза. Реакция 1, катализируемая тирозиназой, нарушается при отрицательном по тирозиназе альбинизме глаз и кожи.

На рис. 32.9 суммированы реакции биосинтеза эумеланинов и феомеланинов с указанием образующихся интермедиатов. Начальная реакция катализируется тирозиназой — медьсодержащим ферментом. **Тирозиназная реакция нарушается при альбинизме глаз и кожи, негативном по тирозиназе** (см. ниже).

Метаболические нарушения биосинтеза меланинов

Принимая во внимание большое число реакций в процессе биосинтеза меланинов, можно полагать, что метаболические нарушения биосинтеза меланинов

могут быть обусловлены мутациями в различных генах.

Понятие «альбинизм» охватывает целый спектр клинических синдромов, характеризующихся **гипомеланозом**, который возникает вследствие наследственных нарушений в пигментных клетках (меланоцитах) глаз и кожи. Известно несколько моделей альбинизма, полученных на грызунах.

Клиническим симптомом, общим для всех 10 форм **альбинизма глаз и кожи** у человека, является пониженная пигментация глаз и кожи. Различия между формами устанавливаются на основе клинических, биохимических, ультраструктурных и генетических характеристик. За исключением доминантной формы, остальные формы альбинизма наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

У пациентов с альбинозом, отрицательным по тирозиназе, полностью отсутствует зрительный пигмент. Волосяные луковицы этих людей не способны превращать in vitro тирозин в пигмент, а их меланоциты содержат непигментированные меланосомы. **У пациентов с альбинозом, положительным по тирозиназе**, имеется небольшое количество зрительного пигмента, однако у детей блондинов пигмента может не быть. Волосы в этом случае могут принимать различные оттенки, от светло-желтого до светло-коричневого, на коже могут быть слабо пигментированные родинки. Меланоциты волосяных луковиц могут содержать слабо пигментированные меланосомы, способные превращать in vitro тирозин в черный эумеланин.

Альбинизм глаз наследуется по аутосомно-рецессивному типу и как признак, сцепленный с X-хромосомой. В последнем случае, а также у гетерозигот (но не в случае аутосомно-рецессивного типа наследования) меланоциты содержат макромеланосомы. У женщин, гетерозиготных по сцепленному с X-хромосомой альбинизму (форма Неттлшип), сетчатка глаз характеризуется мозаичным распределением пигмента из-за случайного характера инактивации X-хромосомы. Метаболические причины, приводящие к гипомеланозу при альбинизме глаз, неизвестны.

Альбиноидизм глаз и кожи наследуется как аутосомно-рецессивный признак. У пациентов (за редким исключением) утрачивается способность к сочетанному нистагму, для них характерны светобоязнь и пониженная острота зрения.

ТИРОЗИН

Тирозин является предшественником адреналина и норадреналина, образующихся в клетках неврального происхождения. При образовании меланина в меланоцитах и норадреналина в нервных клетках промежуточным продуктом является ДОФА, однако гидроксилирование тирозина в клетках различных типов катализируется различными ферментами. **Тирозин-гидроксилаза** является медьнезависимым ферментом, но, так же как и фенилаланин-гидроксилаза, функционирует при участии тетрагидробиоптерина; она катализирует образование в нейронах и клетках надпочечников ДОФА — интермедиата на пути к норадреналину и адреналину (рис. 32.10). **ДОФА-декарбоксилаза,** пиридоксальфосфатзависимый фермент, катализирует образование дофамина. Последний подвергается дальнейшему гидроксилированию при участии дофамин- β-оксидазы, медьсодержащего фермента, который, как полагают, испо-

Рис. 32.10. Превращение тирозина в адреналин и норадреналин в нейронах и клетках надпочечника. PLP – пиридоксальфосфат.

льзует витамин C в реакции образования норадреналина. **В мозговом веществе надпочечника** фермент фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза использует S-аденозилметионин для метилирования первичной аминогруппы норадреналина, в результате образуется адреналин (рис. 32.10).

Тирозин является также предшественником гормонов щитовидной железы — трииодотиронина и тироксина (см. гл. 46).

Тирозин экскретируется с мочой как в свободном состоянии, так и в виде конъюгата с сульфатом; образование таких конъюгатов характерно для большинства фенольных соединений, экскретируемых с мочой.

КРЕАТИН И КРЕАТИНИН

Креатин находится в мышцах, мозгу и в крови как в форме фосфокреатина, так и в свободном состоянии. Следы креатина в норме обнаруживаются и в моче. Креатинин, ангидрид креатина, образуется главным образом в мышцах в результате необратимой неферментативной дегидратации и дефосфорилирования креатинфосфата (рис. 32.11).

Суточное выделение креатинина с мочой у каждого индивидуума поразительно постоянно и пропорционально общей мышечной массе.

В синтезе креатина участвуют три аминокислоты — **глицин, аргинин** и **метионин**. Первая реакция — трансамидинирование (донор-аргинин, акцептор-глицин) с образованием гуанидоацетата (гликоциамина). Процесс происходнт в почках (но не в печени и не в сердечной мышце). Синтез креатина завершается в печени путем метилирования гликоциамина «активным метионином».

γ-АМИНОБУТИРАТ

Биосинтез

γ-Аминобутират образуется путем декарбоксилирования L-глутамата; реакция катализируется пиридоксальфосфат-зависимым ферментом L-глутамат-декарбоксилазой (рис. 32.12). Эта декарбоксилаза находится в тканях центральной нервной системы, преимущественно в сером веществе. Декарбоксилирование L-глутамата является главным путем биосинтеза γ-аминобутирата, однако известно два других пути, у которых исходным соединением для образования γ-аминобутирата является путресцин (рис. 32.5). Один из этих путей включает дезаминирование путресцина с участием диаминоксидазы; другой путь включает образование N-ацетилированных интермедиатов. Относительная значимость трех приведенных путей биосинтеза γ-аминобутирата различна в разных тканях и на разных стадиях развития организма. Например, предшественник полиаминов орнитин (рис. 32.6) эффективно превращается в γ-аминобутират в сетчатке куриных эмбрионов, а также в нервных окончаниях взрослого человека.

Катаболизм

Катаболизм γ-аминобутирата (рис. 32.12) начинается реакцией переаминирования, катализируемой γ-аминобутират-трансаминазой; в результате образуется сукцинат-полуальдегид. Последний может либо восстановиться с образованием γ-гидроксибутирата в результате реакции, катализируемой L-лактатдегидрогеназой, либо окислиться

L-Аргинин
(Почки)
Аргинин-глицин-трансамидиназа
Глицин
Орнитин
Гликоциамин (гуанидоацетат)
(Печень)
(От "активного метионина")
S-Аденозилметионин
ATP
Гуанидоацетат-метилтрансфераза
S-Аденозилгомоцистеин
ADP
Неферментативный процесс в мышце
$P_i + H_2O$
Креатинфосфат
Креатинин

Рис. 32.11. Биосинтез креатина и креатинина.

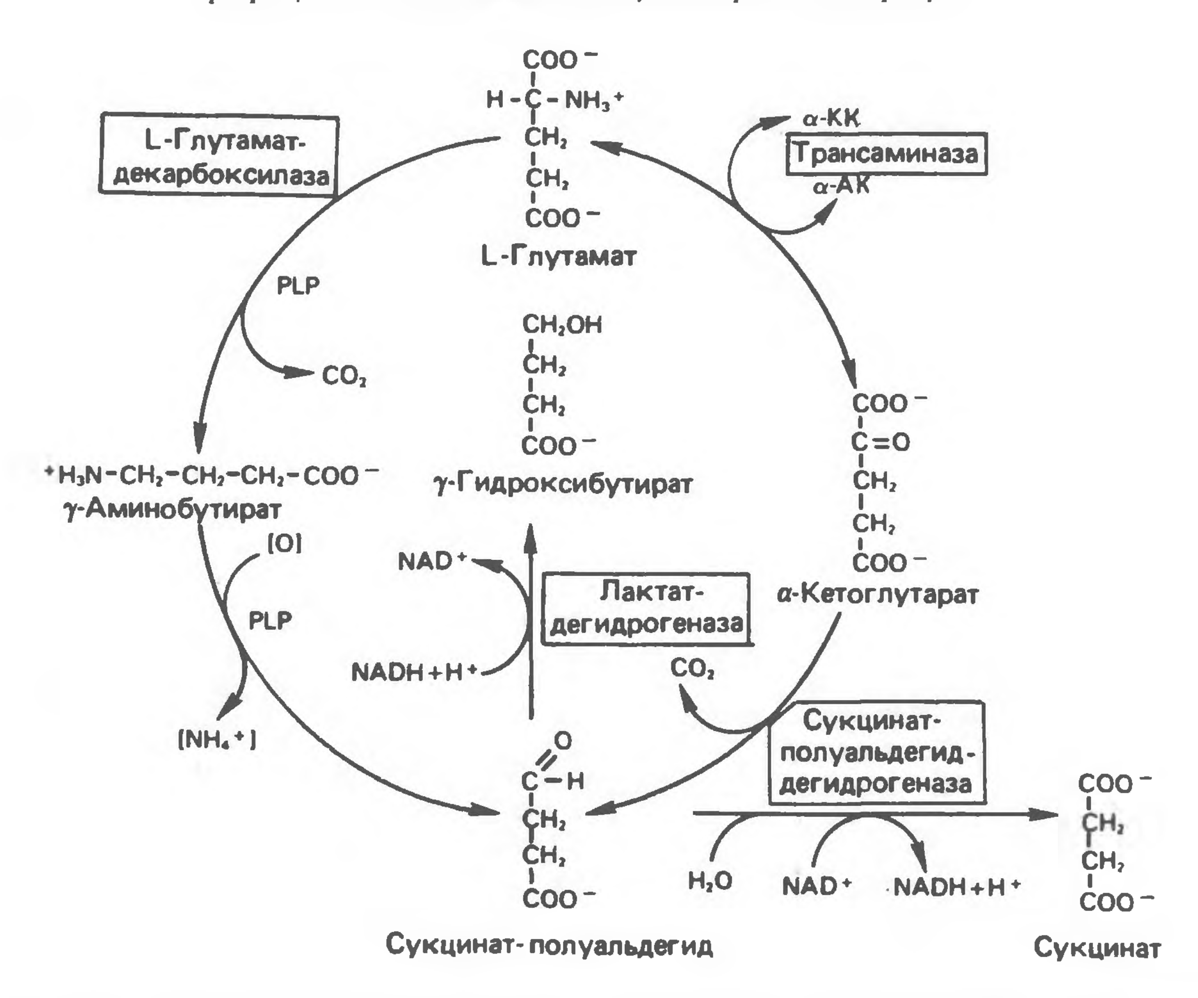


Рис. 32.12. Метаболизм γ-аминобутирата. α-КК — α-кетокислота, α-АК — α-аминокислота, PLP — пиридоксальфосфат.

в сукцинат (интермедиат цикла лимонной кислоты) и далее до CO_2 и H_2O.

Аминомасляная ацидемия

γ-Аминобутират, как и другие анионы ω-аминокислот, медленно транспортируется через плазматические мембраны клеток. Содержание γ-аминобутирата в моче изменяется синхронно с его содержанием в сыворотке. Биохимические нарушения, приводящие к аминомасляной ацидемии, не выяснены, возможно, что нарушается процесс переаминирования, приводящий к образованию сукцинат-полуальдегида из γ-аминобутирата.

ЛИТЕРАТУРА

Stanbury J. B. et al. (eds), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., McGraw-Hill, 1983.

Tabor C. W., Tabor H. Polyamines, Annu. Rev. Biochem., 1984, **53**, 749.

Глава 33

Порфирины и желчные пигменты

Роберт Марри

ВВЕДЕНИЕ

Предметом этой главы является биохимия порфиринов и желчных пигментов. Эти разделы биохимии тесно связаны, так как из порфиринов и железа образуется гем, а продуктами деградации последнего являются желчные пигменты и железо.

БИОМЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Сведения по биохимии порфиринов и гема являются основой, необходимой для понимания различных функций гемопротеинов в организме (транспорт кислорода, транспорт электронов, метаболизм лекарственных соединений и т. д.). Порфирии — это группа заболеваний, обусловленных нарушениями биосинтеза различных порфиринов. Эти заболевания встречаются сравнительно редко, но практикующие врачи должны о них знать; больные порфирией могут обратиться к дерматологам, гепатологам и психиатрам; сравнительно часто встречается желтуха, обусловленная повышением содержания в плазме билирубина крови. Это повышение может быть вызвано либо чрезмерным образованием билирубина, либо нарушением его экскреции; оно наблюдается при многих заболеваниях, от вирусного гепатита до рака поджелудочной железы.

ПОРФИРИНЫ

Порфирины представляют собой циклические соединения, образованные четырьмя пиррольными кольцами, связанными между собой метенильными мостиками (рис. 33.1). Характерным свойством порфиринов является их способность образовывать комплексы с ионами металлов, связывающимися с атомами азота пиррольных колец. Примерами служат железопорфирины, в частности **гем**, входящий в состав гемоглобина, и магний-содержащий порфирин **хлорофилл** — пигмент растений, участвующий в фотосинтезе.

В природе металлопорфирины связываются с белками, в результате образуются соединения, играющие важную роль в биологических процессах. К ним относятся:

А. **Гемоглобин** — железопорфирины, связанные с белком глобином. Гемоглобины обладают способностью обратимо связывать кислород, они транспортируют этот газ в системе кровообращения (см. гл. 6). Структура гема показана на рис. 6.2.

Б. **Эритрокруорины** — железопорфиринопротеины, находящиеся в крови и тканевых жидкостях некоторых беспозвоночных; выполняют такую же функцию, как и гемоглобин.

В. **Миоглобины** — дыхательные пигменты, находящиеся в мышечных клетках позвоночных и беспозвоночных. Примером служит миоглобин из сердечной мышцы лошади, закристаллизованный Теорел-

Пиррол

Порфин

($C_{20}H_{14}N_4$)

Рис. 33.1. Молекула порфина. Кольца обозначены цифрами I, II, III и IV. Места присоединения замещающих групп обозначены номерами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Метенильные мостики обозначены буквами α, β, γ и δ.

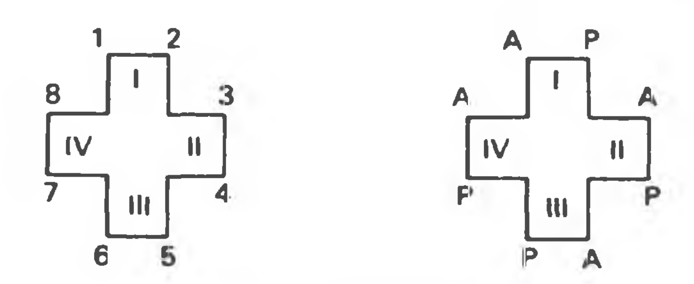


Рис. 33.2. Уропорфирин III.

лом в 1934 г. Молекула миоглобина сходна по структуре с субъединицей гемоглобина.

Г. Цитохромы — соединения, функционирующие как переносчики электронов в окислительно-восстановительных реакциях. Важным примером служит **цитохром *c***, молекулярная масса которого составляет около 13 000, содержащий 1 грамм-атом железа на моль белка.

Д. Каталазы — железопорфириновые ферменты; несколько каталаз получено в кристаллическом виде. В растениях каталазная активность незначительна, сходные функции у них выполняет другой железопорфириновый фермент — пероксидаза.

Е. Триптофанпирролаза. Этот фермент катализирует окисление триптофана в формилкинуренин. Он также является железопорфириновым белком.

Структура порфиринов

Встречающиеся в природе порфирины являются соединениями, у которых 8 атомов водорода порфиринового ядра замещены различными боковыми группами, как показано на рис. 33.1. Упрощенный способ изображения положения заместителей предложен Фишером: пиррольные кольца (без метенильных мостиков) изображаются как выступы крестообразной структуры, пронумерованные вершины которой являются местами присоединения заместителей (рис. 33.2). Различные порфирины показаны на рис. 33.2, 33.3 и 33.4; использованы следующие сокращения: А (ацетат) = $-CH_2COOH$; Р (пропионат) = $-CH_2CH_2COOH$; М(метил) = $-CH_3$; V (винил) = $-CH=CH_2$.

Расположение замещающих группы А и Р в уропорфирине асимметрично (в кольце IV по сравнению с другими кольцами порядок присоединения ацетатных и пропионатных групп изменен на обратный). Порфирин с такого типа **асимметричным замещением** классифицируется как порфирин типа III. Порфирин с полностью симметричным расположением замещающих групп классифицируется как порфирин типа I. В природе встречаются только порфирины типа I и III, причем **тип III** встречается значительно чаще (рис. 33.3).

Оба соединения, приведенные на рис. 33.4, относятся к порфиринам типа III (метильные группы расположены асимметрично, как в копропорфирине типа III). Однако иногда их классифицируют как принадлежащие к типу IX, поскольку они оказались на девятом месте в серии изомеров, постулированных Гансом Фишером, автором пионерских исследований в области химии порфиринов.

Биосинтез порфиринов

Хлорофилл — растительный пигмент фотосинтезирующей системы и гем — железопротопорфирин гемоглобина животных синтезируются в живых клетках по общему метаболическому пути. Исходным материалом являются «активный сукцинат» — сукцинил-СоА, образующийся в митохондриях в реакциях цикла лимонной кислоты, и аминокислота **глицин**. Необходима также «активация» глицина пиридоксальфосфатом. Вероятно, глицин образует

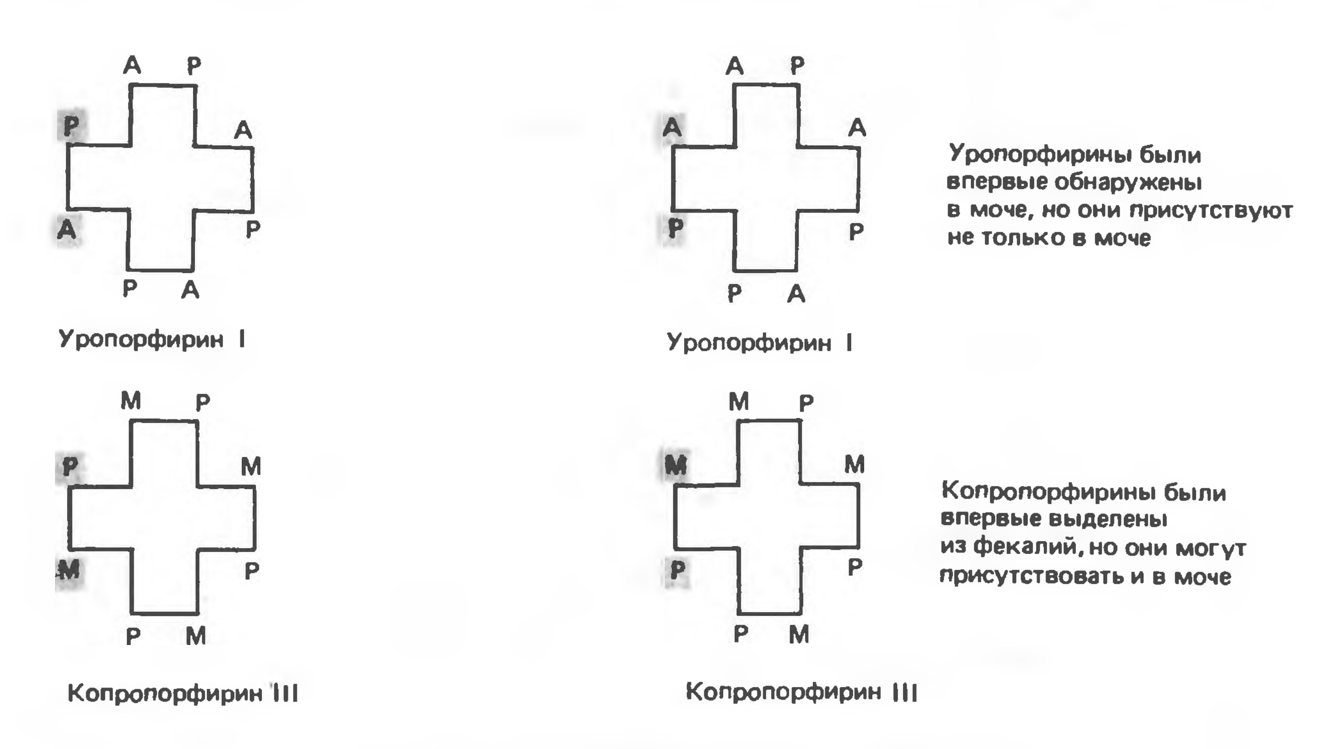


Рис. 33.3. Уропорфирины и копропорфирины.

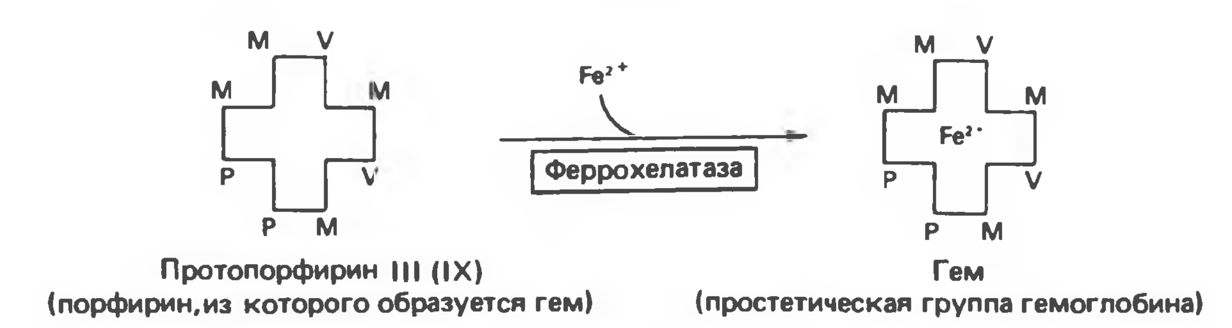


Рис. 33.4. Присоединение железа к протопорфирину приводит к образованию гема.

с пиридоксалем шиффово основание; далее α-углерод глицина присоединяется к карбонильному углероду сукцината. Продуктом реакции конденсации глицина с сукцинил-СоА является α-амино-β-кетоадипиновая кислота, она быстро декарбоксилируется с образованием δ-аминолевулината (АЛК) (рис. 33.5). Эта стадия катализируется ферментом **АЛК-синтазой**. Вероятно, именно этот фермент является **скорость-контролирующим** при биосинтезе порфиринов в печени млекопитающих. Синтез аминолевулиновой кислоты происходит **в митохондриях**. В цитозоле фермент **АЛК-дегидратаза** катализирует конденсацию двух молекул АЛК с образованием двух молекул воды и одной молекулы порфобилиногена (рис. 33.5). АЛК-дегидратаза является Zn-содержащим ферментом и ингибируется ионами свинца.

Образование тетрапиррола (т. е. порфирина) осуществляется путем конденсации четырех монопирролов, образующихся из порфобилиногена (рис. 33.6). Несущий аминогруппу углерод молекулы порфобилиногена («бывший» α-углерод глицина) становится углеродом метиленовой группы (α, β, γ, δ), соединяющей соседние пиррольные кольца в тетрапиррольную структуру. Хотя превращение порфибилиногена в порфирин может происходить просто при нагревании в кислой среде (например, в кислой моче), в тканях это превращение катализируется специфическими ферментами.

Как уже было отмечено выше, в природе встречаются только порфирины типов I и III; то обстоятельство, что более широко представлены изомеры типа III, можно объяснить тем, что биологически важные порфирины (гем и цитохромы) являются изомерами типа III.

В настоящее время детали образования уропорфириногенов путем конденсации порфобилиногенов не ясны. Образование из порфобилиногена уропорфириногена III, интермедиата при биосинтезе гема, катализируется комплексом двух ферментов. **Уропор-**

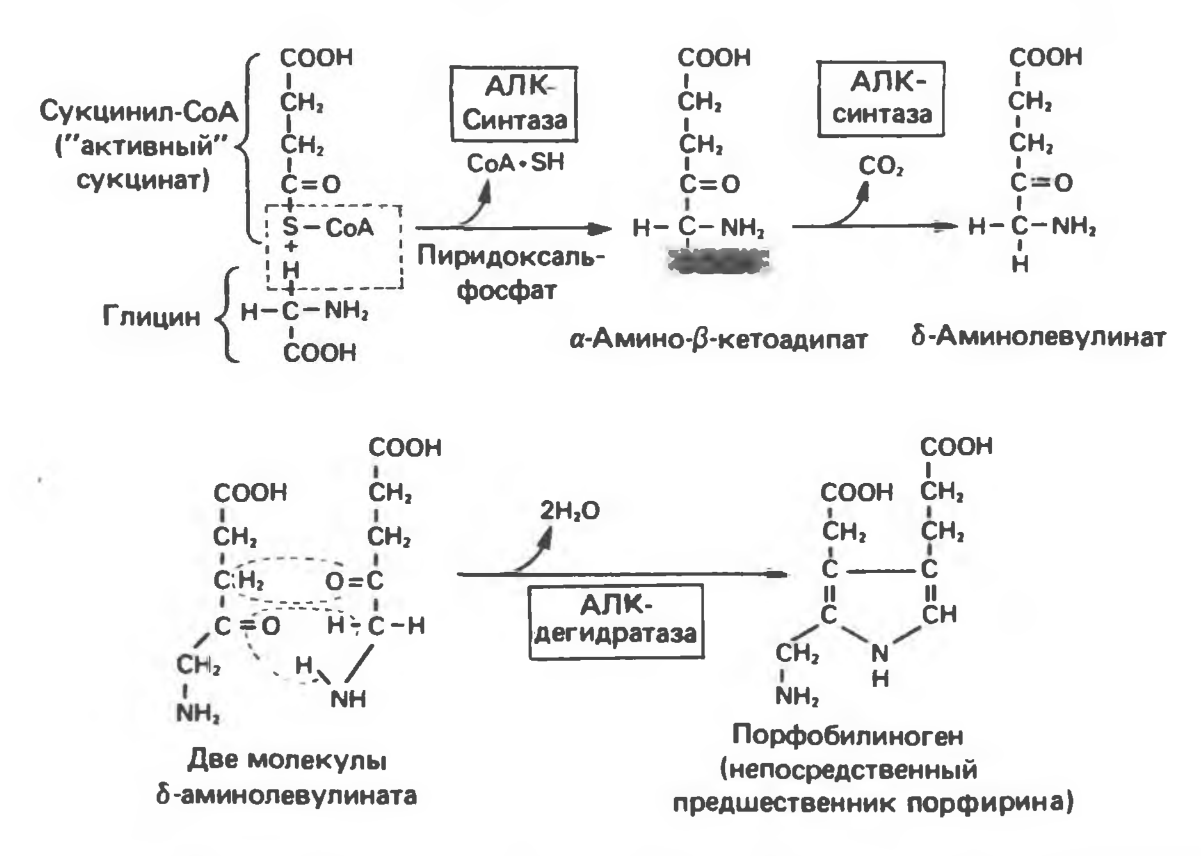


Рис. 33.5. Биосинтез порфобилиногена. АЛК-синтаза находится в митохондриях, тогда как АЛК-дегидратаза находится в цитозоле.

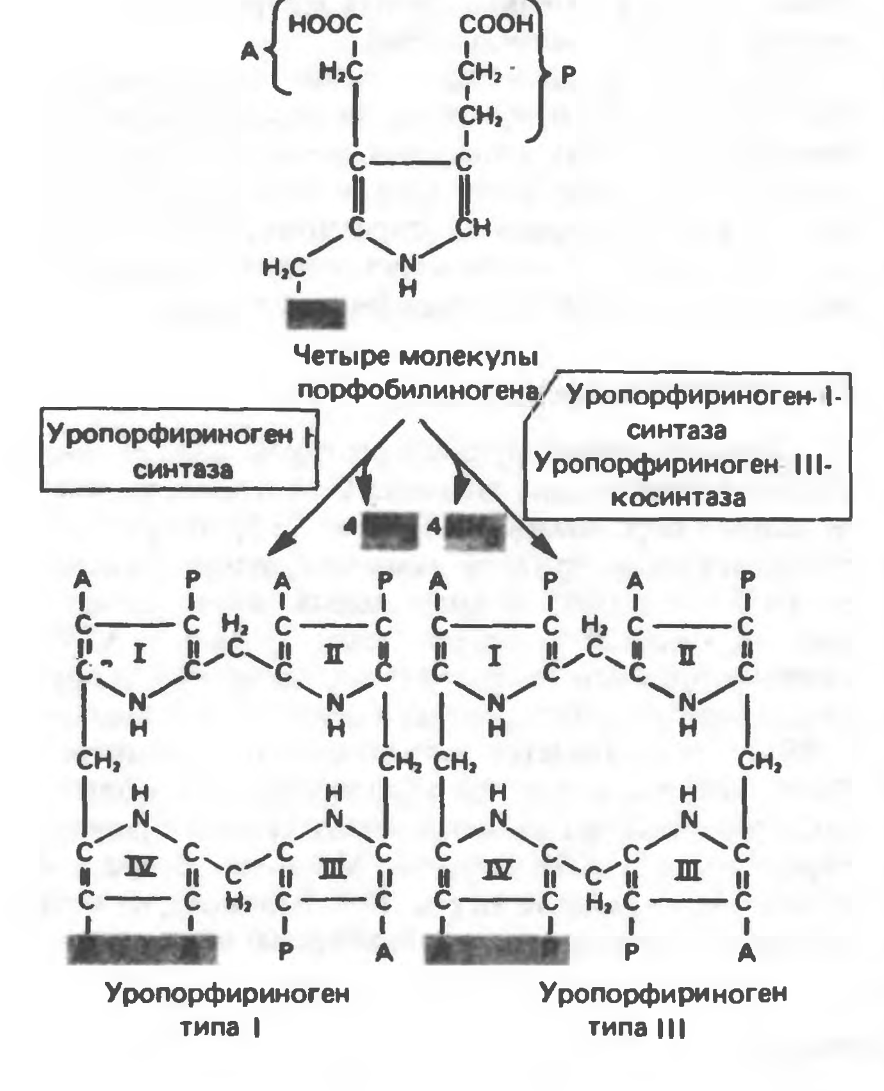


Рис. 33.6. Превращение порфобилиногена в уропорфириногены.

фириноген-I-синтаза, называемая также порфобилиноген-дезаминазой, катализирует in vitro конденсацию порфобилиногена в уропорфириноген I (рис. 33.6). Однако в присутствии второго фермента — **уропорфириноген-III-косинтазы** в результате взаимодействия двух ферментов происходит образование уропорфириногена III, а не его симметричного изомера (уропорфириногена I) (рис. 33.6). При нормальных условиях образуется почти исключительно изомер типа III, но при некоторых видах порфирии (рассматриваемых ниже) синтезируются в значительном количестве изомеры типа I.

Обратите внимание, что в этих уропорфириногенах пиррольные кольца соединены **метиленовыми мостиками**, т. е. у них нет сопряженной системы. Поэтому эти соединения (и вообще все порфириногены) **бесцветны**. Однако порфириногены легко подвергаются автоокислению в соответствующие порфирины. Окисление стимулируется светом и уже образовавшимися порфиринами.

Уропорфириноген III превращается в копропорфириноген III путем декарбоксилирования всех ацетатных групп (А), вместо которых остаются метильные группы (М). Эта реакция катализируется **уропорфириноген-декарбоксилазой**, которая также способна катализировать превращение уропорфириногена I в копропорфириноген I (рис. 33.7). Копропорфириноген III далее поступает в митохондрии, где превращается в протопорфириноген III, а затем в протопорфирин III. Это превращение, вероятно, включает несколько стадий. Митохондриальный фермент **копропорфириногеноксидаза** катализирует декарбокси-

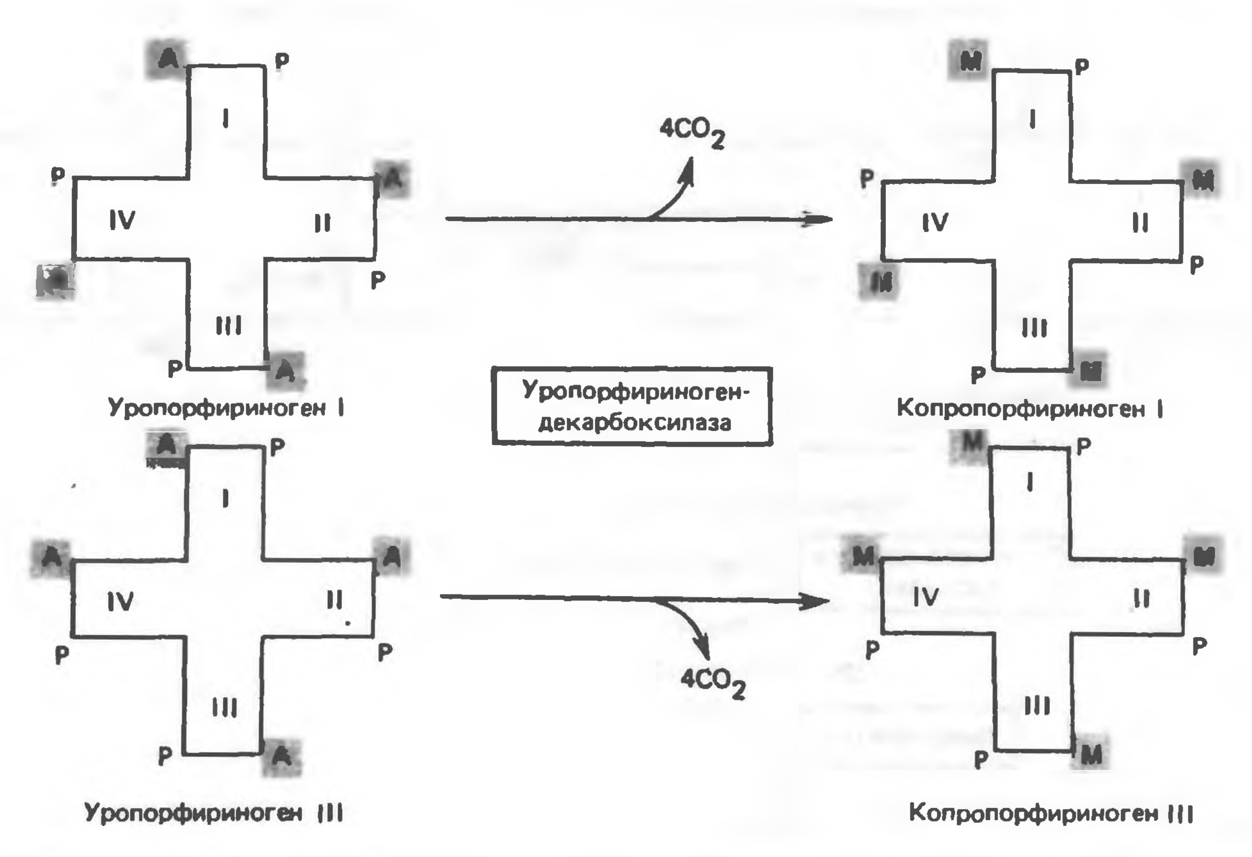


Рис. 33.7. Декарбоксилирование уропорфириногенов с образованием копропорфириногенов (в цитозоле). А — ацетатная группа, М — метильная группа, Р — пропионильная группа.

лирование и окисление двух пропионовых боковых цепей, это приводит к образованию протопорфириногена. Этот фермент действует только на копропорфириноген типа III, чем, по-видимому, и объясняется отсутствие протопорфирина типа I в природных материалах. Окисление протопорфириногена в протопорфирин катализируется другим митохондриальным ферментом — **протопорфириногеноксидазой**. В печени млекопитающих превращение копропорфириногена в протопорфирин требует присутствия молекулярного кислорода.

Образование гема

Завершающей стадией синтеза гема является включение в протопорфирин двухвалентного железа; эта реакция катализируется митохондриальным ферментом **гем-синтазой** или **ферро-хелатазой** (рис. 33.4). Реакция легко идет и в отсутствие фермента, однако при добавлении тканевых препаратов ее скорость намного выше благодаря присутствию в тканях ферментов, катализирующих образование хелатов железа.

Сводная схема биосинтеза производных порфирина из порфобилиногена представлена на рис. 33.8. Биосинтез гема идет в большинстве тканей млекопитающих, за исключением зрелых эритроцитов, которые не содержат митохондрий.

Описанные выше порфириногены бесцветны и по сравнению с соответствующими **окрашенными порфиринами** содержат 6 дополнительных атомов водорода. В настоящее время ясно, что именно эти восстановленные порфирины (порфириногены), а не соответствующие порфирины являются интермедиатами при биосинтезе протопорфирина и гема.

Регуляция биосинтеза гема

Скорость-лимитирующей реакцией синтеза гема является конденсация сукцинил-СоА и глицина, приводящая к образованию АЛК (рис. 33.5); эта реакция катализируется синтазой аминолевулиновой кислоты (АЛК-синтазой). В нормальных тканях, способных осуществлять синтез гема, уровень АЛК-синтазной активности значительно ниже уровня других ферментов, участвующих в синтезе гема. Однако АЛК-синтаза является регуляторным ферментом. Полагают, что гем путем взаимодействия с молекулой апорепрессора является отрицательным регулятором синтеза АЛК-синтазы. Механизм репрессии схематически показан на рис. 33.9. Вероятно, на этой стадии происходит также ингибирование гемом по

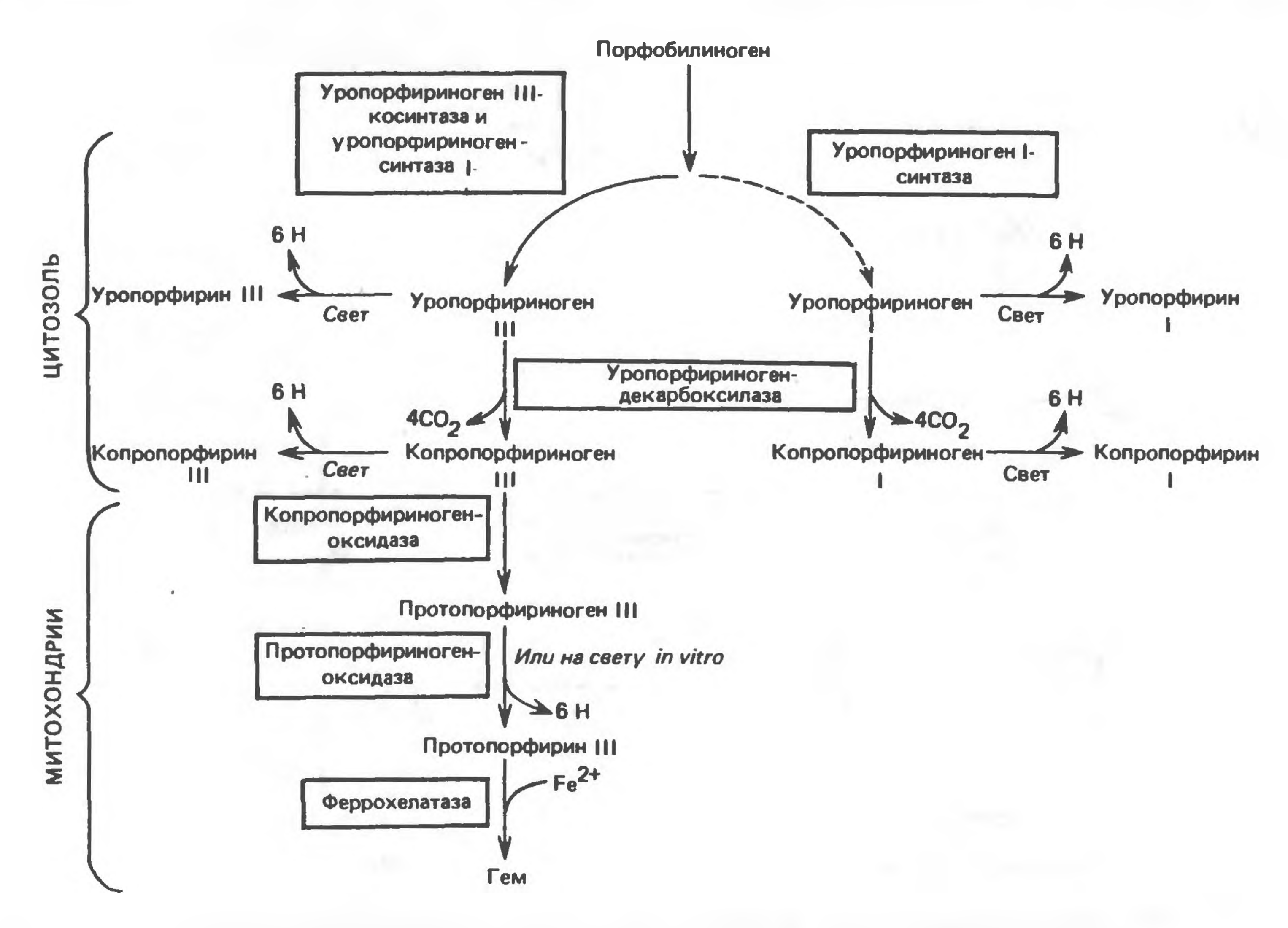


Рис. 33.8. Стадии биосинтеза производных порфирина из порфобилиногена.

принципу обратной связи, однако главный регуляторный эффект гема состоит в том, что синтез АЛК-синтазы значительно ускоряется в отсутствие гема и замедляется в его присутствии. Скорость обновления АЛК-синтазы в печени млекопитающих в норме велика (время полужизни около 1 ч), что не является неожиданным для фермента, катализирующего скорость-лимитирующую реакцию.

Многие соединения различной структуры, включая применяемые в настоящее время инсектициды,

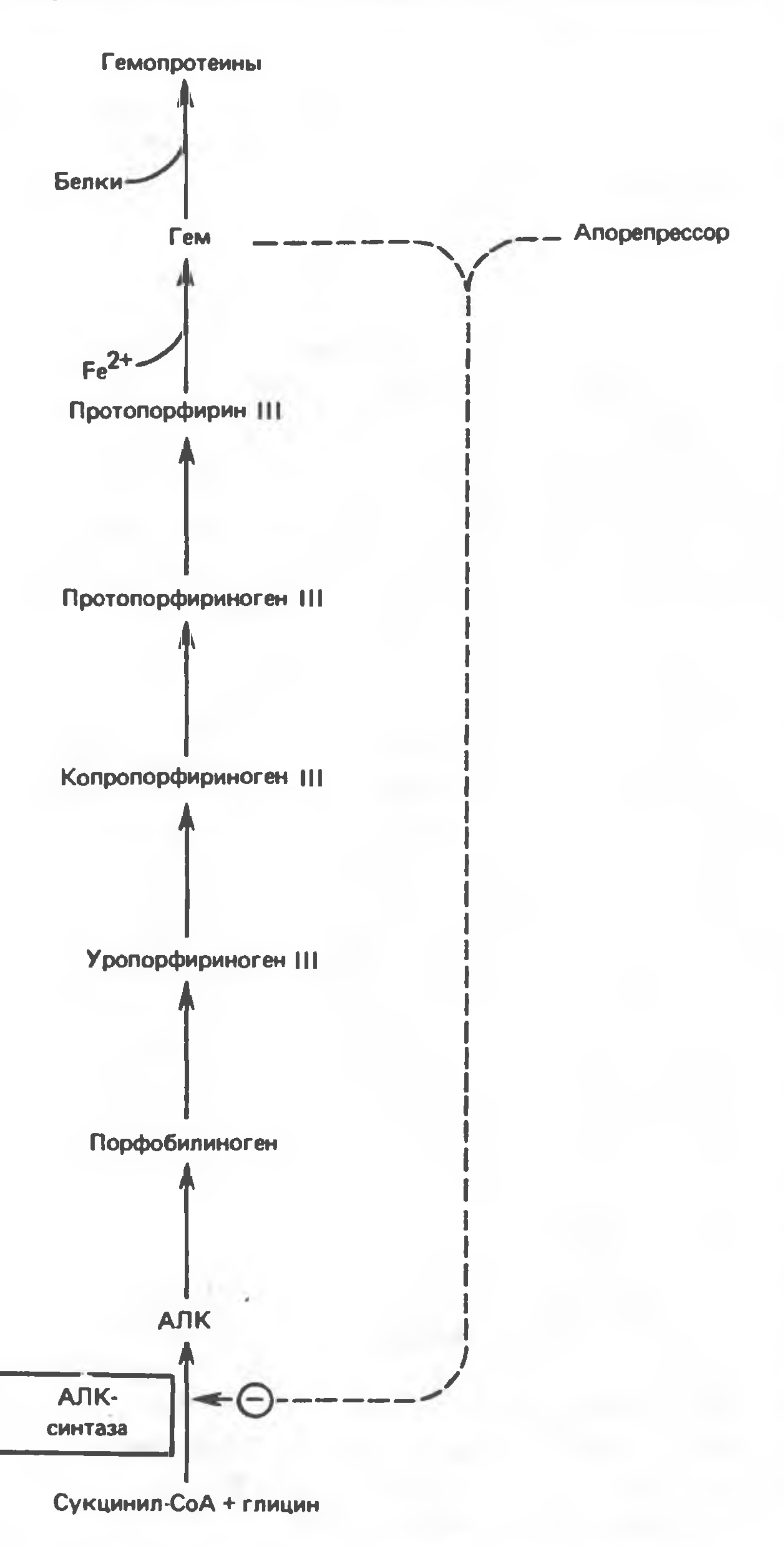


Рис. 33.9. Регуляция синтеза гема на стадии, катализируемой АЛК-синтазой, по механизму репрессии и дерепрессии синтеза АЛК-синтазы с участием гема и его гипотетического апорепрессора. Штриховая линия показывает отрицательную (⊖) регуляцию путем репрессии синтеза АЛК-синтазы.

канцерогенные и фармацевтические препараты, могут значительно повышать содержание в печени АЛК-синтазы. Большинство лекарственных соединений метаболизируется в печени системой, в которую входит специфический гемопротеин цитохром Р-450. В процессе метаболизма этих соединений значительно возрастает потребление гема системой цитохрома Р-450, в результате чего внутриклеточная концентрация гема снижается. Это в свою очередь вызывает дерепрессию синтеза АЛК-синтазы и как следствие — повышение скорости синтеза гема для обеспечения потребностей клетки.

На индукцию АЛК-синтазы в печени оказывают действие и некоторые другие факторы. Глюкоза может тормозить индукцию АЛК-синтазы; железо в хелатной форме оказывает синергический эффект при индукции печеночной АЛК-синтазы; стероиды способствуют дерепрессии АЛК-синтазы in vivo лекарственными препаратами. Введение же в организм гематина может препятствовать дерепрессии АЛК-синтазы (подобное же действие характерно и для гемопротеинов). В эритропоэтических тканях активность АЛК-синтазы возрастает при гипоксии, в то же время на активность АЛК-синтазы в печени гипоксия не оказывает влияния.

Важная роль этих регуляторных механизмов будет обсуждаться ниже, когда будут рассматриваться заболевания, относящиеся к группе порфирий.

Химия порфиринов

Благодаря присутствию третичных азотов в двух пирроленовых кольцах порфирины обладают свойствами слабых оснований. Порфирины же, содержащие карбоксильные группы в одной или нескольких боковых цепях, являются также и кислотами. Их изоэлектрические точки находятся в пределах значений 3,0—4,5 ; в области этих значений pH порфирины легко выпадают в осадок.

Различные порфириногены бесцветны, тогда как **все порфирины окрашены**. При изучении порфиринов и их производных большое значение имеют характерные для них спектры поглощения как в видимой, так и в ультрафиолетовой области. Примером может служить кривая поглощения раствора порфирина в 5%-ной соляной кислоте (рис. 33.10). Обратите внимание на резкий максимум поглощения вблизи длины волны 400 нм. Это отличительный признак порфинового ядра, характерный для всех порфиринов независимо от природы боковых цепей. Этот максимум называют **полосой Соре**, по имени ее первооткрывателя. Гематопорфирин в кислой среде имеет помимо полосы Соре два более слабых максимума при 550 и 592 нм.

Если растворы порфиринов в сильных минеральных кислотах или органических растворителях облучать ультрафиолетовым светом, они испускают ин-

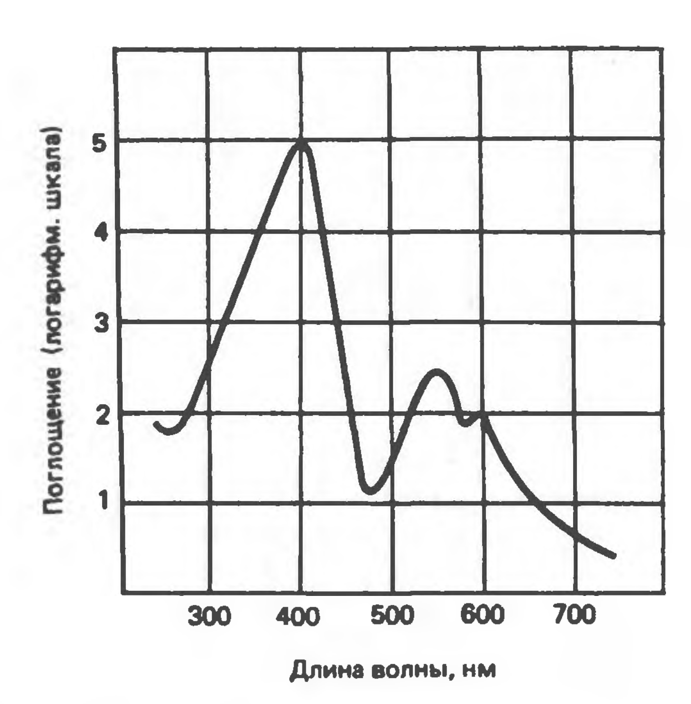


Рис. 33.10. Спектр поглощения гематопорфирина (0,01%-ный раствор гематопорфирина в 5%-ной HCl).

тенсивное красное флуоресцентное свечение. Эта **флуоресценция** столь характерна, что часто используется для обнаружения малых количеств свободных порфиринов. Поглощение и флуоресценция порфиринов обусловлены наличием двойных связей; как уже упоминалось, восстановление метенильных (– HC =) мостиков (путем присоединения водородов) в метиленовые (– CH_2 –) приводит к образованию бесцветных **порфириногенов**.

Присоединение металла к порфирину изменяет его спектр поглощения в видимой области. Примером может служить протопорфирин — предшественник гема, свободный от железа. В щелочном растворе в спектре порфирина имеется несколько узких и интенсивных полос поглощения (при 645, 591 и 540 нм), тогда как для гема характерна широкая полоса поглощения в виде плато, простирающегося от 540 до 580 нм.

Определение порфиринов

Копропорфирины и уропорфирины представляют значительный клинический интерес, поскольку при порфириях наблюдается увеличение экскреции этих соединений. Копропорфирины I и III растворимы в смесях эфира и ледяной уксусной кислоты, из которых их можно затем экстрагировать соляной кислотой. Уропорфирины, напротив, в этих смесях нерастворимы, но частично растворимы в этилацетате, и их можно экстрагировать соляной кислотой. Полученные солянокислые растворы при облучении ультрафиолетовым светом дают характерное красное флуоресцентное свечение. Характерные полосы поглощения могут быть зарегистрированы с помощью спектрофотометра.

Таблица 33.1. Верхние пределы нормальной экскреции порфиринов и их предшественников и содержание их в эритроцитах [1)]

	Моча (мкг · сут $^{-1}$)	Фекалии (мкг/г сухой массы)	Эритроциты (мкг/100 мл клеточной суспензии)
АЛК	4000	—	—
Порфобилиноген	1500	—	—
Уропорфирин	50	5	Следы
Копропорфирин	300	50	3
Протопорфирин	—	120	80

[1)] Воспроизведено (с разрешения), с изменениями, из обзора Meyer U. A., Schmid R. The porphyrias. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th ed. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds). McGraw-Hill, 1978.

В табл. 33.1 приведены верхние пределы нормальной экскреции порфиринов и их предшественников. У здоровых людей содержание в моче копропорфиринов составляет в среднем около 67 мкг·сут$^{-1}$; на изомер типа I приходится в среднем 14 мкг·сут$^{-1}$, на изомер типа III — 53 мкг·сут$^{-1}$. Отклонение от этого нормального соотношения при экскреции копропорфиринов типа I и III может служить диагностическим признаком при некоторых заболеваниях печени.

Последовательно образующиеся в процессе синтеза гема из АЛК интермедиаты становятся все более гидрофобными. Образование копропорфириногена сопровождается удалением ацетильных групп уропорфириногена; при превращении копропорфириногена в протопорфириноген происходит декарбоксилирование двух пропионильных групп. Это повышение гидрофобности отражается на распределении интермедиатов биосинтеза гема в составе мочи и фекалий. Более полярный уропорфириноген экскретируется преимущественно с мочой, тогда как более гидрофобные копропорфириноген и протопорфириноген оказываются преимущественно в желчи и удаляются в составе фекалий.

ПОРФИРИИ

Порфириями называют гетерогенную группу заболеваний, характеризующихся повышенным выделением порфиринов или их предшественников. Некоторые формы порфирии являются **наследственными**, другие — **приобретенными**. Было предложено несколько различных классификаций порфирий. Наследственные формы удобно разделить на три большие группы — **эритропоэтические**, **печеночные** и такие формы, при которых нарушения метаболизма наблюдаются одновременно в эритропоэтической и печеночной тканях (табл. 33.2). Для большинства наследуемых форм характерно наличие метабо-

Таблица 33.2. Классификация порфирий человека [1]

Состояние	Тип наследования	Установленный или предполагаемый дефектный фермент	Ткань, в которой выражены метаболические нарушения
Врожденная эритропоэтическая порфирия (болезнь Гюнтера)	Аутосомно-рецессивный	Уропорфириноген-I-синтаза и(или) уропорфириноген-III-косинтаза	Эритроидные клетки
Печеночные формы порфирии			
Перемежающаяся острая порфирия	Аутосомно-доминантный	Уропорфириноген-I-синтаза	Печень
Наследственная копропорфирия	Аутосомно-доминантный	Копропорфириногеноксидаза	Печень
Мозаичная порфирия	Аутосомно-доминантный	Протопорфириногеноксидаза	Печень
Поздняя порфирия кожи	Аутосомно-доминантный (?)	Уропорфириноген-декарбоксилаза	Печень
Токсическая порфирия	Приобретенное состояние	Различные нарушения	Печень
Протопорфирия	Аутосомно-доминантный	Феррохелатаза	Эритроидные клетки и печень (?)

[1] Воспроизведено, с разрешения, из обзора Meyes U. A., Schmid R. The porphyrias. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th ed. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds). McGraw-Hill, 1978.

лических нарушений во всех тканях, однако проявляются они по каким-то причинам в каком-то одном типе тканей. Ниже приводится описание биохимических нарушений, характерных для порфирий.

Для каждого типа порфирии характерен набор экскретируемых с мочой порфиринов и их предшественников. Эти данные и их связь с различными стадиями синтеза гема приведены на рис. 33.11.

Перемежающаяся острая порфирия (ПОП) является признаком аутосомно-доминантной наследственной болезни человека, которая обычно проявляется только после достижения половой зрелости. Ее причиной является наследуемая частичная недостаточность **уропорфириноген-I-синтазы**. Больные гетерозиготны по дефектному структурному гену, поэтому активность уропорфириноген-I-синтазы в их клетках составляет 50% от нормы. Пациенты с ПОП экскретируют с мочой большие количества **порфобилиногена** и АЛК. Оба этих соединения **бесцветны**, но порфобилиноген на свету и воздухе самопроизвольно образует два окрашенных продукта — порфобилин и порфирин. Это является причиной **потемнения мочи при ее стоянии** на свету при доступе воздуха.

Порфобилиноген и АЛК присутствуют в плазме и спинномозговой жидкости больных, особенно в период резкого обострения. Лекарственные препараты и стероидные гормоны, метаболизм которых требует участия гемсодержащих белков, таких, как цитохром Р-450, могут ускорять наступление обострения. Соединения, индуцирующие порфирию в процессе метаболизма, повышают потребление гемовых белков и тем самым снижают внутриклеточную концентрацию гема; это приводит к дерепрессии синтеза АЛК-синтазы. Повышение активности АЛК-синтазы и частичное блокирование уропорфириноген-I-синтазы приводит к значительному накоплению АЛК и порфобилиногена; это сопровождается острыми болями в животе, рвотой, запором, сердечно-сосудистыми нарушениями, а также нервно-психическими расстройствами. Следует отметить, что, согласно экспериментальным данным, снижение содержания гема угнетает активность триптофанпирролазы и приводит к накоплению нейроактивных соединений — триптофана и 5-гидрокситриптамина.

У пациентов с ПОП **не наблюдается повышенной чувствительности к свету**, которая характерна для других печеночных порфирий. Этого следовало ожидать, поскольку у больных не накапливаются ни порфирины, ни порфириногены, так как метаболическое нарушение синтеза гема происходит на стадии, *предшествующей* образованию первого порфириногена (уропорфириногена).

Как отмечено выше, метаболические нарушения обнаруживаются и в других клетках, в частности, в эритроцитах, а также в выращенных в культуре фибробластах или клетках амниотической жидкости; однако повышенная активность АЛК-синтазы, приводящая к перепроизводству АЛК и порфобилиногена, **наблюдается преимущественно в печени**. Видимо, это связано с тем, что печень является тем самым органом, в котором протекает метаболизм индуцирующих агентов. Острая порфирия служит одним из редких примеров болезни, фенотипически выраженной у гетерозигот, при этом недостаточность фермента составляет только 50%.

Как и можно было предсказать на основании

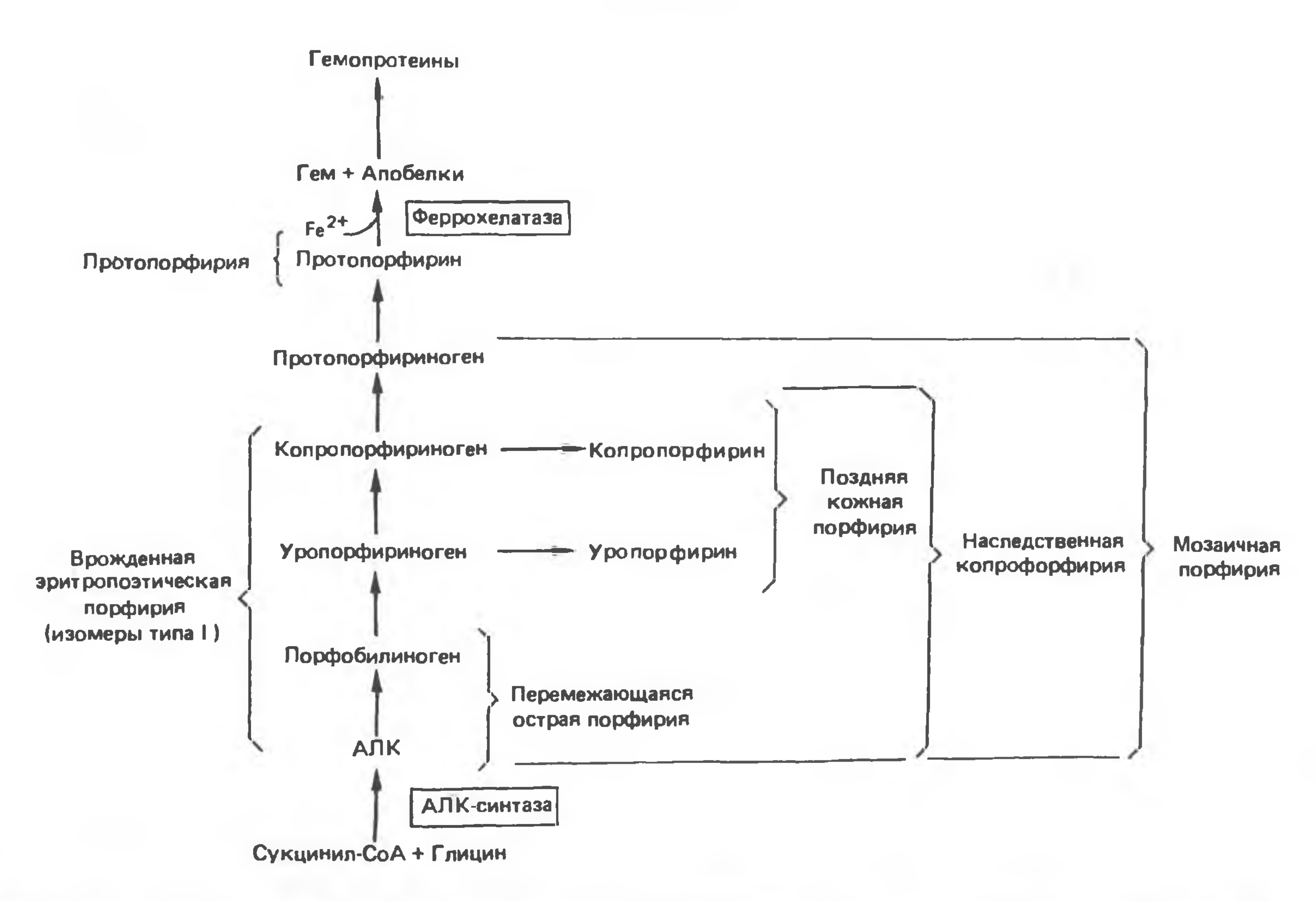


Рис. 33.11. Последовательные стадии биосинтеза гема, с указанием предшественников, экскретируемых с мочой, при различных формах порфирии. Фигурные скобки объединяют соединения, которые экскретируются с мочой в избыточных количествах при обострении указанных форм порфирии. АЛК — δ-аминолевулиновая кислота. (Воспроизведено с изменениями из статьи Kaufmaп L., Merver H. S. Biochemical defects in two types of human hepatic prphyria. N. Engl. J. Med. 1970:**283**:954.)

предложенного механизма регуляции синтеза АЛК-синтазы системой **репрессии-дерепрессии, введение гематина** пациентам с ПОП может уменьшить индукцию АЛК-синтазы и тем самым облегчить протекание заболевания.

Врожденная эритропоэтическая порфирия — это еще более редкое врожденное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Молекулярная природа этой болезни точно неизвестна; установлено, однако, что для нее характерен определенный дисбаланс относительных активностей уропорфириноген-III-косинтазы и уропорфириноген-I-синтазы. Образование уропорфириногена I в количественном отношении значительно превосходит синтез уропорфириногена III — нормального изомера на пути синтеза гема. Хотя генетическое нарушение распространяется на все клетки, проявляется оно по неизвестной причине преимущественно в эритропоэтической ткани. Пациенты с врожденной эритропоэтической порфирией экскретируют большие количества **изомеров типа I** уропорфириногена и копропорфириногена; в моче оба этих соединения самопроизвольно окисляются в уропорфирин I и копропорфирин I — красные флуоресцирующие пигменты. Сообщалось о случае, когда наблюдалось небольшое повышение концентрации уропорфирина III, но отношение изомеров типа I и III составляло примерно 100:1. Циркулирующие эритроциты содержат большое количество уропорфирина I, однако наивысшая концентрация этого порфирина отмечена в клетках костного мозга (но не в гепатоцитах).

Вероятно, вследствие образования меньших количеств истинного предшественника гема, уропорфириногена III, и возникающего вследствие этого относительного дефицита гема в эритропоэтических тканях больных происходит индукция АЛК-синтазы. Эта индукция приводит к перепроизводству порфириногенов типа I. Наряду с усилением синтеза АЛК-синтазы и перепроизводством порфириногенов типа I повышаются образование и экскреция порфобилиногена и АЛК. Таким образом, на основе биохимических отклонений можно предсказывать появление клинических симптомов, сходных с теми, которые наблюдаются при ПОП, но помимо этого отмечается **светочувствительность кожи**, обу-

словленная характером спектра поглощения порфириновых соединений, которые образуются в больших количествах. У пациентов отмечаются трещины на коже, часто наблюдаются гемолитические явления.

Наследственная копропорфирия — аутосомно-доминантное нарушение, обусловленное дефицитом **копропорфириноген-оксидазы** — митохондриального фермента, ответственного за превращение копропорфириногена III в протопорфириноген IX. Копропорфириноген III в больших количествах удаляется из организма в составе фекалий, а также вследствие его растворимости в воде экскретируется в большом количестве с мочой. Как и уропорфириноген, копропорфириноген на свету и воздухе быстро окисляется, превращаясь в красный пигмент копропорфирин.

Ограниченная при этом заболевании способность к синтезу гема (особенно в стрессовых условиях) приводит к дерепрессии АЛК-синтазы. В результате наблюдается избыточное образование АЛК и порфобилиногена, а также других интермедиатов на пути синтеза гема, образующихся на стадиях, предшествующих наследственно заблокированному этапу. Соответственно у пациентов с наследственной копропорфирией обнаруживаются все признаки и симптомы, связанные с избытком АЛК и порфобилиногена, которые характерны для перемежающейся острой порфирии, но помимо этого у них имеется повышенная светочувствительность, обусловленная присутствием избыточных количеств копропорфириногенов и уропорфириногенов. При этом заболевании введение гематина также может вызвать по крайней мере частичную репрессию АЛК-синтазы и смягчение симптомов, обусловленных перепроизводством интермедиатов биосинтеза гема.

Мозаичная порфирия, или наследственная фотокопропорфирия, является аутосомно-доминантным нарушением, при котором происходит частичное блокирование ферментативного превращения протопорфириногена в гем. В норме это превращение осуществляется двумя ферментами, протопорфириногеноксидазой и феррохелатазой, локализованными **в митохондриях**. Судя по данным, полученным на культуре фибробластов кожи, у больных мозаичной порфирией содержание протопорфириногеноксидазы составляет лишь половину нормального количества. У пациентов с мозаичной порфирией наблюдается относительная недостаточность содержания гема в стрессовых условиях, а также дерепрессированное состояние печеночной АЛК-синтазы. Как отмечалось выше, повышенная активность АЛК-синтазы ведет к перепроизводству всех интермедиатов синтеза гема на участках перед заблокированной стадией. Таким образом, пациенты с мозаичной порфирией экскретируют с мочой избыточные количества АЛК, порфобилиногена, уропорфирина и копропорфирина, а с фекалиями выделяют уропорфирин, копропорфирин и протопорфирин. Моча больных пигментирована и флуоресцирует, а кожа чувствительна к свету так же, как и у больных поздней кожной порфирией (см. ниже).

Поздняя кожная порфирия, вероятно, является наиболее распространенной формой порфирии. Обычно она связана с теми или иными поражениями печени, особенно при избыточном потреблении алкоголя или перегрузке ионами железа. Природа метаболического нарушения точно не установлена, но вероятной причиной является частичная недостаточность **уропорфириноген-декарбоксилазы**. Нарушение, по-видимому, передается как аутосомно-доминантный признак, но генетическая пенетрантность различна и в большинстве случаев зависит от наличия нарушений функций печени. В соответствии с предсказаниями моча содержит повышенные количества уропорфиринов типа I и III; в то же время экскреция с мочой АЛК и порфобилиногена наблюдается сравнительно редко. Иногда моча содержит весьма значительное количество порфиринов, придающих ей розоватый оттенок; при подкислении она чаще всего дает в ультрафиолетовой области розовую флуоресценцию.

Печень содержит большие количества порфиринов и поэтому сильно флуоресцирует, тогда как у эритроцитов и клеток костного мозга флуоресценция отсутствует. Главным клиническим проявлением при поздней кожной порфирии является повышенная **светочувствительность кожи**. У больных не наблюдается ни повышенной активности АЛК-синтазы, ни соответственно избыточного содержания в моче порфобилиногена и АЛК; это коррелирует с отсутствием острых приступов, характерных для перемежающейся острой порфирии.

Протопорфирия, или эритропоэтическая протопорфирия, по-видимому, обусловлена доминантно наследуемой недостаточной активностью **феррохелатазы** в митохондриях всех тканей; клинически эта болезнь проявляется как острая крапивница, вызываемая воздействием солнечных лучей. Эритроциты, плазма и фекалии содержат повышенные количества протопорфирина IX, а ретикулоциты (незрелые эритроциты) и кожа (при исследовании с помощью биопсии) часто флуоресцируют красным светом.

Печень, вероятно, тоже вносит вклад в повышение образования протопорфирина IX, однако экскреции с мочой порфиринов и их предшественников не наблюдается.

Приобретенная (токсическая) порфирия может быть вызвана действием токсических соединений, таких, как гексахлорбензол, соли свинца и других тяжелых металлов, а также лекарственными препаратами, например гризеофульвином. Тяжелые металлы являются ингибиторами ряда ферментов в системе синтеза гема, включая АЛК-дегидратазу, уропорфириноген-синтазу и феррохелатазу.

КАТАБОЛИЗМ ГЕМА: ОБРАЗОВАНИЕ ЖЕЛЧНЫХ ПИГМЕНТОВ

При физиологических условиях в организме взрослого человека разрушается 1—2·10[8] эритроцитов в час. Таким образом, в течение суток у человека массой 70 кг обновляется приблизительно 6 г гемоглобина. При разрушении гемоглобина его белковая часть (глобин) может быть использована как таковая или после гидролиза в форме составляющих ее аминокислот; железо гема включается в общий пул железа и также снова используется. Вместе с тем свободная от железа порфириновая часть гема обязательно деградирует; это в основном происходит в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезенки и костного мозга.

Катаболизм гема, освобожденного из любых гемовых белков, осуществляется в микросомальной фракции ретикулоэндотелиальных клеток сложной ферментной системой — гем-оксигеназой. К моменту поступления гема из гемовых белков в гем-оксигеназную систему железо обычно окисляется в ферри-форму (гем превращается в гемин); гемин может легко связываться с альбумином с образованием метгемальбумина. Гем-оксигеназная система индуцируется субстратом. Она локализована около микросомальной системы транспорта электронов. Как показано на рис. 33.12, гемин восстанавливается в ферро-форму с помощью NADPH; далее при участии NADPH кислород присоединяется к α-метенильному мостику между пиррольными кольцами I и II. Ферро-форма железа снова окисляется

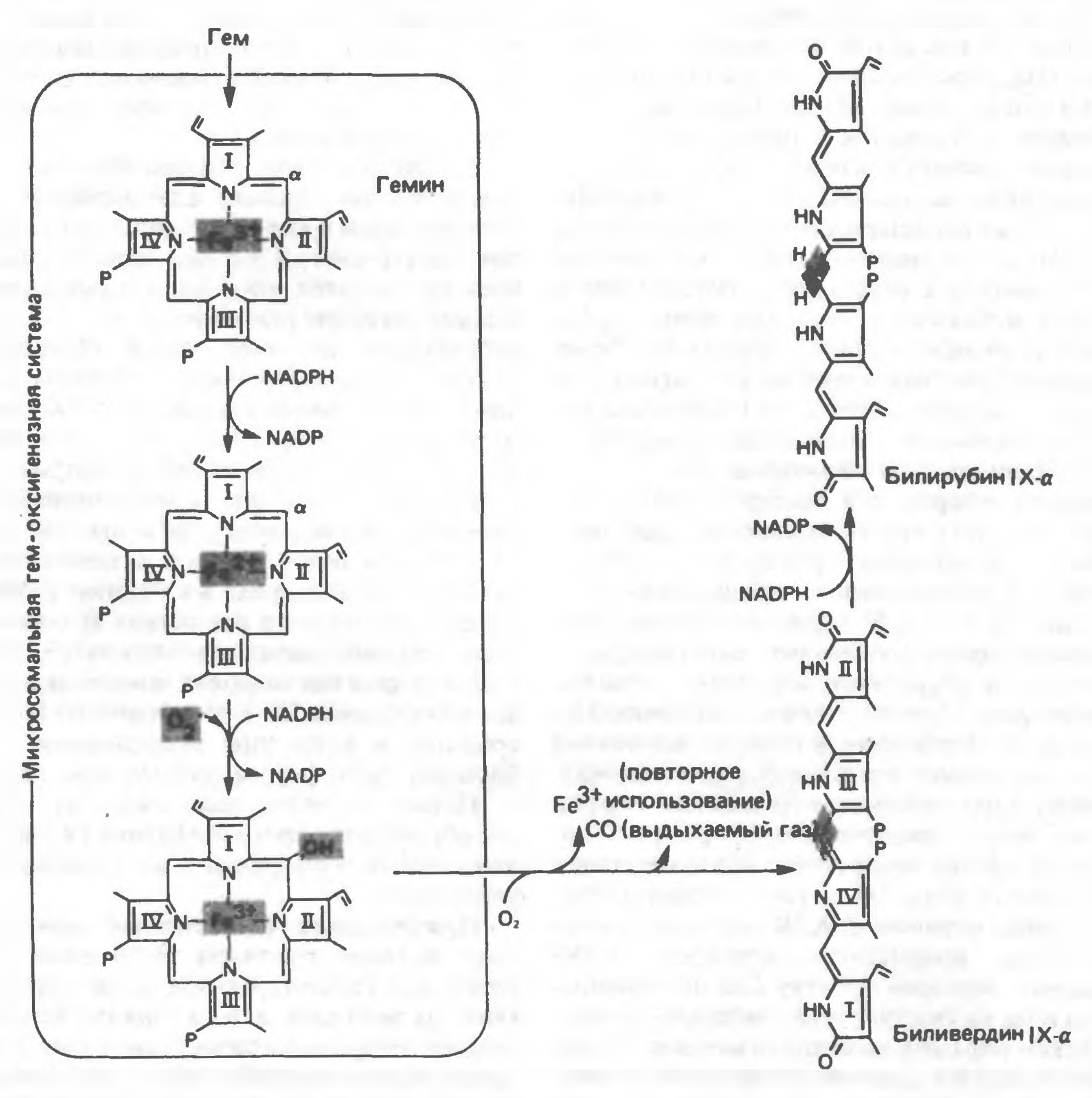


Рис. 33.12. Схема микросомальной гем-оксигеназной системы. (Воспроизведено с изменениями из обзора Schmid R., McDonough A. E. The Porphyrins. Dolphin D. (ed.). Academic Press, 1978.)

в ферри-форму. При последующем присоединении кислорода происходит освобождение **ферри-иона**, выделение молекулы **окиси углерода** и образование в результате раскрытия тетрапиррольного кольца эквимолярного количества **биливердина IX-α**. В этой реакции сам гем участвует в роли катализатора.

У птиц и земноводных зеленый пигмент биливердин IX-α экскретируется из организма; у млекопитающих растворимый фермент **биливердинредуктаза** катализирует восстановление метенильного мостика между пирролами III и IV в метиленовую группу, в результате образуется желтый пигмент **билирубин IX-α** (рис. 33.12).

По расчету из 1 г гемоглобина образуется 35 мг билирубина. Суточное образование билирубина у взрослого человека составляет приблизительно 250—350 мг.

Химическое превращение гема в билирубин ретикулоэндотелиальными клетками можно наблюдать in vivo: в гематоме обусловленный гемом пурпурный цвет медленно переходит в желтый цвет билирубина.

Дальнейшей метаболизм билирубина в основном происходит в печени. Он складывается из трех процессов: 1) поглощение билирубина паренхимальными клетками печени; 2) конъюгация билирубина в гладком эндоплазматическом ретикулуме и 3) секреция билирубина из эндоплазматического ретикулума в желчь. Рассмотрим каждый из процессов в отдельности.

Поглощение билирубина печенью

Билирубин слаборастворим в плазме и воде; в плазме он специфически связывается с альбумином. Каждая молекула альбумина имеет, по-видимому, два центра связывания билирубина — высоко- и низкоаффинный. В 100 мл плазмы может содержаться 25 мг билирубина, **прочно связанного с альбумином** по его высокоаффинному центру. «Избыточный» билирубин связывается с альбумином менее прочно; он легко отделяется от альбумина, диффундируя в ткани. Ряд соединений — антибиотики и некоторые другие лекарственные вещества — конкурируют с билирубином за высокоаффинный центр альбумина. Эти соединения могут вытеснять билирубин из комплекса с альбумином и проявляют значительное клиническое действие.

В печени происходит переход билирубина от альбумина на синусоидальную поверхность гепатоцитов при участии насыщаемой системы переноса, в функционировании которой участвует некий переносчик. Эта система облегченного транспорта имеет очень большую емкость и даже при патологических условиях не лимитирует скорость метаболизма билирубина.

Поскольку система облегченного транспорта обеспечивает установление равновесия билирубина по обе стороны синусоидальной мембраны гепатоцита, поглощение билирубина зависит от его потребления в последующих метаболических процессах.

Конъюгация билирубина

В печени к билирубину присоединяются полярные группы и он переходит в водорастворимую форму, которая секретируется в желчь. Процесс, обеспечивающий **повышение растворимости в воде** (т. е. повышение полярности) билирубина, называется конъюгацией. Этот процесс, по крайней мере на начальных стадиях, протекает в гладком эндоплазматическом ретикулуме и осуществляется специальным набором ферментов. У млекопитающих билирубин секретируется в желчь преимущественно в форме **билирубиндиглюкуронида** (рис. 33.13). Сначала происходит образование билирубинмоноглюкуронида, которое катализируется **UDP-глюкуронилтрансферазой** — ферментом, присутствующим в гладком эндоплазматическом ретикулуме и состоящим, вероятно, из нескольких компонентов. Катализируемая реакция представлена на рис. 33.14. Она протекает главным образом в печени, а также в почках и слизистой кишечника. При нарушении метаболизма билирубина его конъюгаты находятся в сыворотке преимущественно в форме моноглюкуронидов.

Образование диглюкуронида билирубина может происходить в канальцах мембраны гепатоцитов при участии UDP-глюкуронилтрансферазы, подобной рассмотренной выше (рис. 33.14) или другого фермента дисмутазы, которая катализирует превращение двух молекул билирубинмоноглюкуронида в молекулу билирубиндиглюкуронида и молекулу свободного билирубина (рис. 33.14). Система конъюгации билирубина будет рассматриваться ниже в связи с наследственными нарушениями ее работы.

Активность UDP-глюкуронилтрансферазы может индуцироваться рядом используемых в клинике лекарств, в частности фенобарбиталом.

Секреция билирубина в желчь

Секреция конъюгированного билирубина в желчь идет против весьма высокого градиента концентрации и должна осуществляться с помощью механизма активного транспорта. **Активный транспорт** является, вероятно, **скорость-лимитирующей** стадией всего процесса метаболизма билирубина в печени. Транспорт конъюгированного билирубина из печени в желчь индуцируется теми же лекарствами, которые способны индуцировать конъюгацию билирубина. Таким образом, системы конъюгации билирубина и его вывода из гепатоцитов работают как единый

Рис. 33.13. Структура билирубиндиклюкуронида (конъюгированный «прямой» билирубин). Глюкуроновая кислота присоединяется эфирной связью к двум группам пропионовой кислоты с образованием ацилглюкуронида.

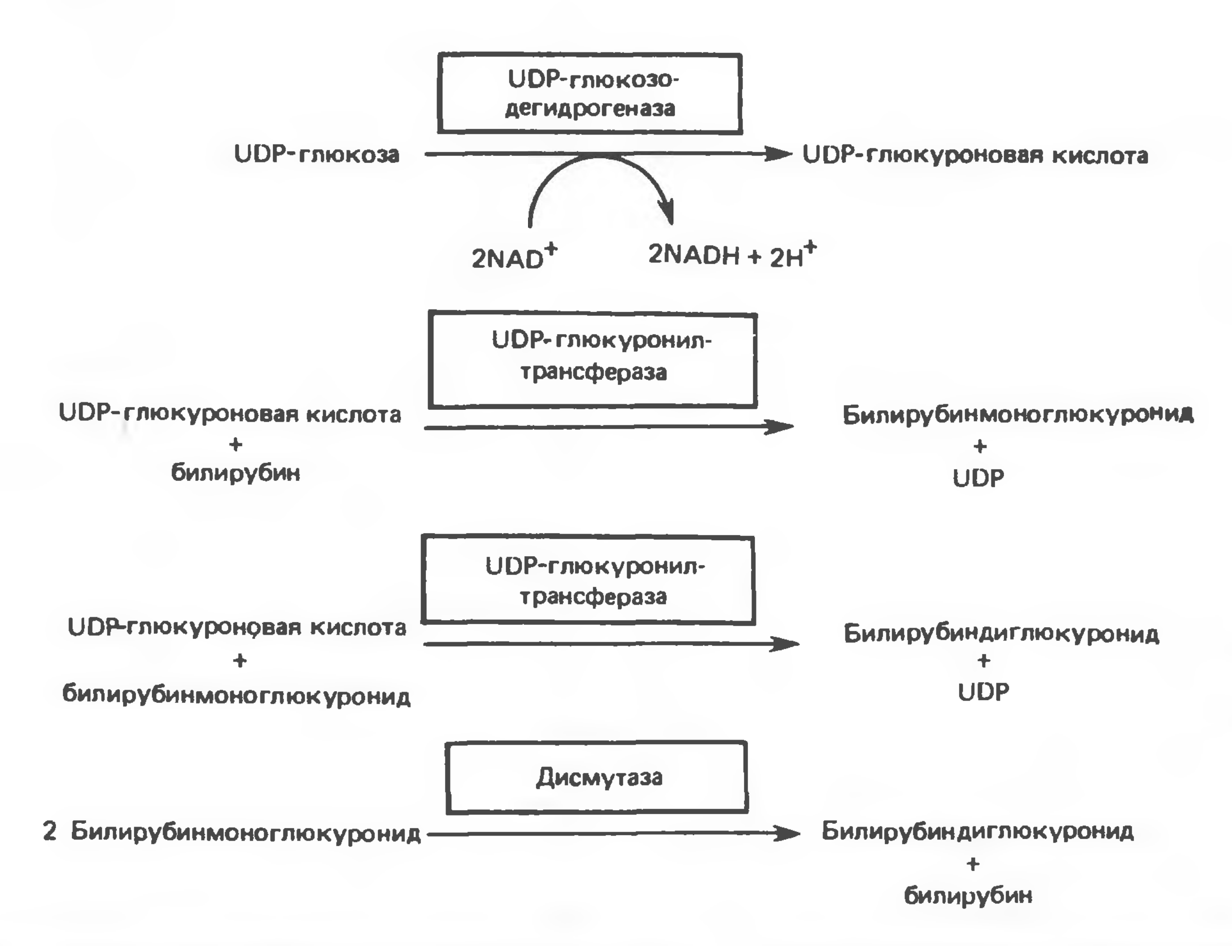


Рис. 33.14. Конъюгирование билирубина с глюкуроновой кислотой. Донором глюкуроната является UDP-глюкуроновая кислота, образующаяся из UDP-глюкозы.

функционально координируемый механизм.

При физиологических условиях практически весь секретируемый в желчь билирубин (свыше 97%) находится в конъюгированной форме. Только после светотерапии заметные количества неконъюгированного билирубина могут быть обнаружены в желчи.

В печени имеются многочисленные системы секреции в желчь природных и синтетических лекарственных соединений после их метаболизма. Некоторые из этих систем используются также билирубиндиглюкуронидами.

МЕТАБОЛИЗМ БИЛИРУБИНА В КИШЕЧНИКЕ

После того как билирубин достигает области подвздошной и толстой кишок, глюкурониды гидролизуются специфическими бактериальными ферментами (**β-глюкуронидазами**); далее кишечная микрофлора восстанавливает пигмент с образованием группы бесцветных тетрапиррольных соединений, называемых уробилиногенами (рис. 33.15). В подвздошной и толстой кишках небольшая часть уробилиногенов снова всасывается и попадает в печень, т.е. осуществляется **внутрипеченочный уробилиногеновый цикл**. При патологических состояниях, например при

Мезобилирубиноген ($C_{33}H_{44}O_6N_4$)

Стеркобилиноген (L-уробилиноген)

Стеркобилин (L-уробилин)

Рис. 33.15. Структура некоторых желчных пигментов.

накоплении избыточных количеств желчных пигментов или при заболеваниях печени, нарушающих работу внутрипеченочного цикла, уробилиноген может экскретироваться с мочой.

В норме большая часть **бесцветных уробилиногенов**, образующихся в толстой кишке под действием кишечной микрофлоры, окисляется в уробилины (окрашенные соединения) и удаляется с фекалиями (рис. 33.15). Наблюдаемое потемнение последних на воздухе является следствием окисления оставшихся уробилиногенов в уробилины.

ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИЯ

В тех случаях, когда содержание билирубина в крови превышает 1 мг/100 мл (17,1 мкмоль·л$^{-1}$), говорят о состоянии гипербилирубинемии. Гипербилирубинемия может быть следствием образования билирубина в большем количестве, чем то, которое нормальная печень может экскретировать, или же следствием **повреждений печени, нарушающих экскрецию билирубина** в нормальных количествах. Помимо повреждений самой печени к развитию гипербилирубинемии приводит закупорка желчевыводящих протоков печени, препятствующая выделению билирубина. Во всех этих ситуациях билирубин накапливается в крови и по достижении определенных концентраций диффундирует в ткани, окрашивая их в желтый цвет. Это состояние называют **желтухой.**

При клиническом обследовании больных желтухой ценную информацию дает определение содержания билирубина в сыворотке. Метод количественного анализа билирубина в сыворотке был впервые предложен Ван ден Бергом на основе разработанного Эрлихом метода определения содержания билирубина в моче. Реакция Эрлиха основана на использовании диазосульфаниловой кислоты (диазореагент Эрлиха), образующей при соединении с билирубином красновато-пурпурное азосоединение. В первоначальной методике Эрлиха использовался метанол, в котором растворим и билирубин, и диазореагент. Ван ден Берг при анализе желчи пациента на содержание желчного пигмента случайно не добавил метанол и с удивлением обнаружил, что окрашивание идет «прямым» путем и без метанола. Впоследствии эту форму билирубина, которая способна вступать в реакцию без добавления метанола, назвали формой, **определяемой в «прямой реакции»**. Такую же прямую реакцию затем обнаружили в сыворотке больных желтухой, вызванной закупоркой желчных протоков. Однако для обнаружения билирубина в нормальной сыворотке все-таки необходимо добавлять метанол; то же относится к анализу на избыточное содержание билирубина в сыворотке при гемолитической желтухе, не связанной с закупоркой желчных протоков. Ту форма билирубина, которая дает реакцию только после добавления метанола, назвали формой, определяемой в **«непрямой реакции»**.

В настоящее время известно, что **«непрямой»** билирубин — это **«свободный» (неконъюгированный) билирубин**, транспортируемый в печень из ретикулоэндотелиальных тканей, где он образуется в результате распада гемопорфиринов. Поскольку эта форма билирубина нерастворима в воде, для ее взаимодействия с диазореагентом необходимо добавление метанола. В печени происходит конъюгирование билирубина с глюкуроновой кислотой, после чего конъюгат — билирубинглюкуронид может секретироваться в желчь. Конъюгированный билирубин растворим в воде и может непосредственно реагировать с диазореагентом; следовательно, **«прямой билирубин»** Ван ден Берга — это на самом деле **конъюгат билирубина** (билирубинглюкуронид).

В зависимости от того, какой тип билирубина присутствует в плазме — неконъюгированный или конъюгированный,— гипербилирубинемия классифицируется как **постгепатитная** (неконъюгированная) и **регургитационная** (конъюгированная) соответственно.

В центральную нервную систему через гематоэнцефалический барьер может проникать только неконъюгированный билирубин; поэтому энцефалопатия, возникающая вследствие гипербилирубинемии (ядерная желтуха), может быть вызвана только постгепатитной билирубинемией. С другой стороны, с мочой может экскретироваться только конъюгированный билирубин. Соответственно этому **холеурическая желтуха** наблюдается только при регургитационнй гипербилирубинемии, тогда как **ахолеурическая желтуха** — только при избытке неконъюгированного билирубина.

Неконъюгированная гипербилирубинемия

Даже при значительном гемолизе неконъюгированная гипербилирубинемия обычно весьма незначительна (менее 4 мг/100 мл, менее 68,4 мкмоль/л) вследствие большой способности печени в отношении конъюгирования билирубина. Если, однако, конъюгирование билирубина в печени оказывается неполноценным вследствие приобретенных или наследственных причин, может наблюдаться весьма выраженная неконъюгированная гипербилирубинемия.

Наиболее распространенной формой неконъюгированной гипербилирубинемии является **«физиологическая желтуха»**, наблюдающаяся как временное состояние у новорожденных. Причиной этой гипербилирубинемии является ускоренный гемолиз и незрелое состояние печеночной системы поглощения, конъюгации и секреции билирубина. При этом не только понижается активность **UDP-глюкуронилтрансферазы**, но и, вероятно, оказывается недостаточным синтез субстрата этого фермента — UDP-глюкуроновой кислоты. Поскольку накапливающийся билирубин находится в неконъюгированной форме, он может преодолевать гаматоэнцефалический барьер, когда его концентрация в плазме превысит уровень насыщения высокоаффинных участков альбумина (20—25 мг/100 мл). Это может привести к гипербилирубинемической токсической энцефалопатии (ядерной желтухе). Поскольку известно, что система конъюгирования билирубина является индуцируемой, оказалось эффективным введение новорожденным с физиологической желтухой фенобарбитала. Кроме того, удалению неконъюгированного билирубина печенью может способствовать воздействие видимого света (механизм неизвестен); в этом случае часть билирубина превращается в производные, которые удаляются с мочой.

А. Синдром Криглера — Найяра типа I; врожденная негемолитическая желтуха. Синдром Криглера — Найяра типа I — метаболическое нарушение конъюгации билирубина. Болезнь может быть охарактеризована как **тяжелая врожденная желтуха**, возникающая вследствие **наследуемого отсутствия** в печеночной ткани **активности билирубин-UDP-глюкуронилтрансферазы**. Болезнь обычно приводит к фатальному исходу в первые 15 месяцев жизни, но отмечены случаи, когда болезнь проявлялась лишь в юношеском возрасте. Больным назначали светотерапию, которая приводила к некоторому снижению содержания билирубина в плазме. Фенобарбитал и другие лекарственные препараты, индуцирующие метаболизм билирубина в нормальной печени, в случае синдрома Криглера — Найяра типа I не оказывали влияния на образование билирубинглюкуронидов. При отсутствии лечения содержание билирубина в сыворотке обычно превышает 20 мг/100 мл.

Б. Синдром Криглера — Найяра типа II. Это редкое наследуемое заболевание, по-видимому, обусловлено менее серьезными дефектами в системе конъюгирования билирубина и характеризуется более доброкачественным течением. Концентрация билирубина в сыворотке обычно не превышает 20 мг/100 мл, весь накапливающийся билирубин относится к неконъюгированному типу. Как ни удивительно, но желчь этих больных содержит билирубинглюкуронид; отсюда возникло предположение, что генетическое нарушение может затрагивать **печеночную UDP-глюкуронилтрансферазу, которая катализирует присоединение второй глюкуронильной группы** к билирубинмоноглюкурониду.

Было показано, что больные с этим синдромом поддаются лечению большими дозами фенобарбитала. Вызванное приемом лекарства снижение гипербилирубинемии, по-видимому, обусловлено индукцией всей системы метаболизма билирубина, а не только стимуляцией конъюгирования билирубина.

В нескольких случаях у предполагаемых гетерозигот с этим нарушением отмечена легкая неконъюгированная гипербилирубинемия, неотличимая от той, которая наблюдается при болезни Гильберта (см. ниже). Вполне возможноо, что аутосомнорецессивный синдром Криглера—Найяра типа II соответствует гомозиготному состоянию для дефекта, который при гетерозиготном состоянии проявляется в виде легкой хронической гипербилирубинемии Гильберта.

В. Болезнь Гильберта. Это заболевание представляет собой гетерогенную группу нарушений, многие из которых, как теперь известно, являются следствием компенсированного гемолиза, сопряженного с неконъюгированной гипербилирубинемией. Имеются, по-видимому, также нарушения, обусловленные **ненормальным снижением поглощения билирубина** паренхиматозными клетками печени. Пониженной у этих больных оказалась и **активность** в печени **билирубин-UDP-глюкуронилтрансферазы**.

Отметим, что доброкачественные нарушения, известные под общим названием «болезни Гильберта», имеют, по-видимому, аутосомно-доминантный характер наследования.

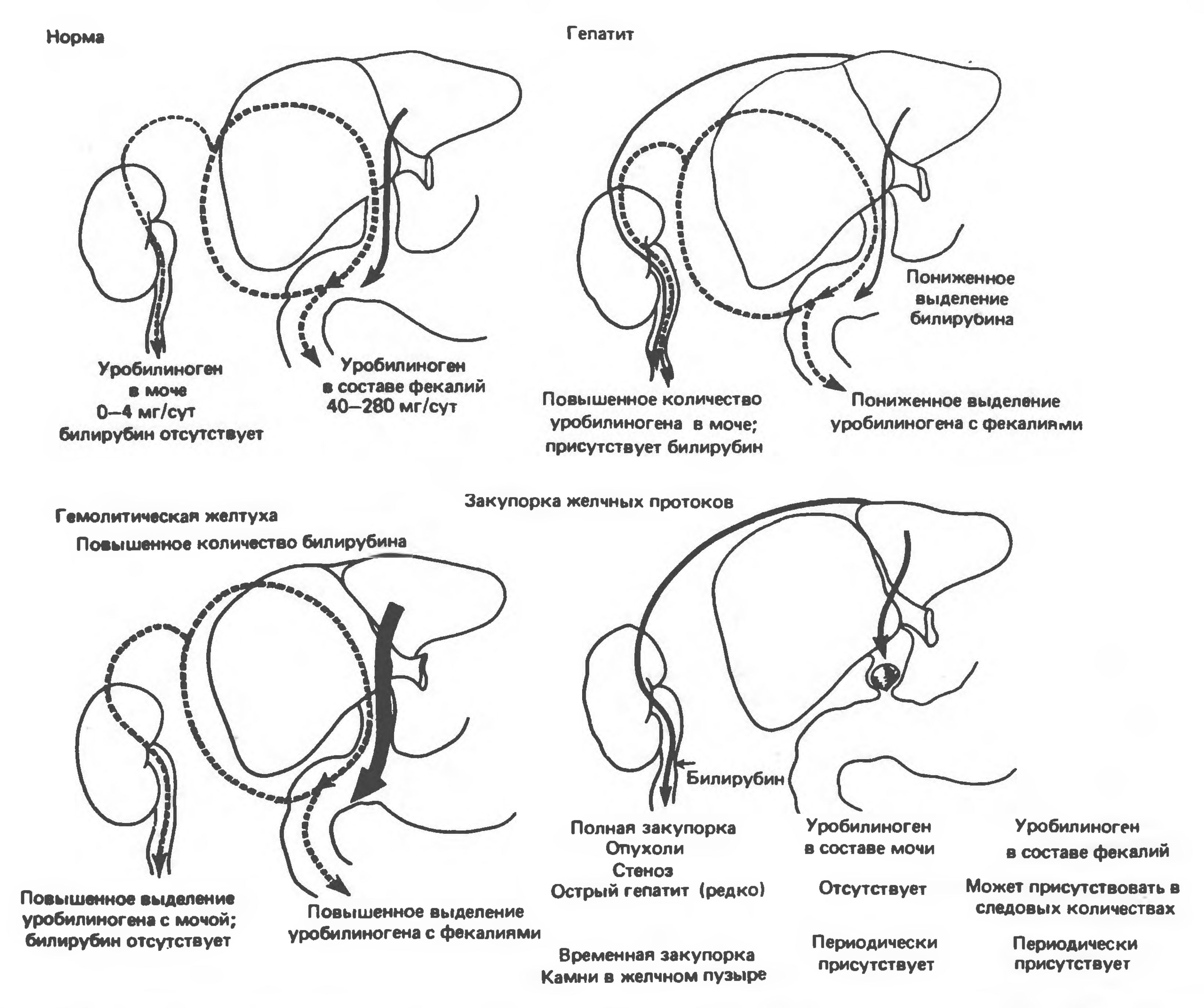


Рис. 33.16. Билирубин-уробилиногеновый цикл. Сплошные стрелки показывают движение билирубиндиклюкуронида, штриховые стрелки — движение уробилиногена. (Воспроизведено, с разрешения, из книги Krupp M. A. et al. Physisian's Handbook, 21st ed. Lange, 1985.)

Г. Токсическая гипербилирубинемия. Неконъюгированная гипербилирубинемия может быть результатом дисфункции печени, наступающей вследствие токсического действия ряда веществ (хлороформа, арсфенаминов, четыреххлористого углерода, ацетаминофена), а также наблюдаемой при вирусном гепатите, циррозе и отравлении грибами рода *Amanita*. Большинство этих приобретенных нарушений является следствием повреждения паренхиматозных клеток печени; часто наблюдается также закупорка системы желчных протоков печени, приводящая к конъюгированной гипербилирубинемии.

Конъюгированная гипербилирубинемия

Поскольку конъюгированный билирубин растворим в воде, он обнаруживается в моче большинства больных конъюгированной гипербилирубинемией; поэтому болезнь часто называют холеурической желтухой.

А. Хроническая идиопатическая желтуха (синдром Дубина — Джонсона). Это аутосомно-рецессивное нарушение проявляется в виде конъюгированной гипербилирубинемии у детей и у взрослых. Причиной этой гипербилирубинемии является, вероятно, **нарушение печеночной секреции конъюгированного билирубина в желчь**. Однако нарушение секреции конъюгированных веществ не ограничивается билирубином, оно касается секреции ряда других конъюгированных соединений, в частности эстрогенов и индикаторных веществ, например красителя сульфобромфталеина. Нарушение секреции конъюгированного сульфобромфталеина приводит к тому, что он снова возвращается в плазму, в которой наблюдается вто-

ричное повышение его концентрации. Данное явление патогномонично для синдрома Дубина — Джонсона. При использовании для анализа других соединений, например индоцианина зеленого или бенгальского розового, секреция которых не требует конъюгации, вторичного повышения концентрации этих соединений в плазме больных не наблюдается. Таким образом, нарушение в данном случае связано с секреторным процессом, который в норме касается только конъюгированных соединений, включая конъюгированные билирубины. Интересно отметить, что у пациентов с синдромом Дубина — Джонсона гепатоциты центральных печеночных долек содержат необычный и пока еще неидентифицированный пигмент.

Закупорка желчных протоков. Конъюгированная гипербилирубинемия возникает также при закупорке печеночных или общего желчного протоков. В этом случае, как полагают, желчный пигмент, поступающий из крови в клетки печени, не может экскретироваться. В результате конъюгированный билирубин поступает в печеночные вены и лимфатические сосуды.

Термин **холестатическая желтуха** используют для всех форм желтухи, связанных с внепеченочной закупоркой, а также для ряда форм паренхиматозной желтухи, которые характеризуются конъюгированной гипербилирубинемией.

Уробилиноген в моче

В норме уробилиноген присутствует в моче лишь в следовых количествах (в среднем суточная порция содержит 0,64 мг уробилиногена; повышение до 4 мг все еще рассматривается как не выходящее за пределы нормы). При полной закупорке желчного протока уробилиноген в моче отсутствует, поскольку билирубин не может попасть в кишечник, где он превратился бы в уробилиноген. В этом случае присутствие в моче билирубина и отсутствие уробилиногена свидетельствуют о наличии **обтурационной** (механической) **желтухи** либо внутрипеченочной, либо внепеченочной.

При **гемолитической желтухе** увеличение образования билирубина приводит к повышенному синтезу уробилиногена, который появляется в моче в больших количествах. Билирубин в моче больных гемолитической желтухой обычно не обнаруживается; таким образом, повышенное содержание в моче уробилиногена и отсутствие билирубина свидетельствуют о гемолитической желтухе. Обусловленное различными причинами усиление деградации кровяных клеток (например, при пернициозной анемии) также приводит к повышенному содержанию в моче уробилиногена. Кроме того, при попадании инфекции в желчные канальцы содержание уробилиногена в моче может повышаться и в отсутствие нарушений функции печени за счет восстановительной активности инфицирующих бактерий.

Схема, приведенная на рис. 33.16, суммирует данные о транспорте билирубина и уробилиногена из печени в кишечник и почки в нормальных условиях, а также при гемолитической желтухе, гепатите или желтухе, обусловленной закупоркой желчных протоков.

ЛИТЕРАТУРА

Battersby A. R. et al. Biosynthesis of the pigments of life: Formation of the macrocycle, Nature, 1980, **285**, 17.

Berk P. D. et al. Disorders of bilirubin metabolism. In: Metabolic Control and Disease, 8th ed., Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds), Saunders, 1980.

Kappas A., Sassa S., Anderson K. E. The porphyrias. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed., Stanbury, J. B. et al. (eds), McGraw-Hill, 1983.

Lemberg R., Legge J. W. Hematin Compounds and Bile Pigments, Interscience, 1949.

Schmid R., McDonough A. F. Formation and metabolism of bile pigments *in vivo*. In: The Porphyrins, Dolphin D. (ed.), Academic Press, 1978.

Tschudy D. P., Lamon J. M. Porphyrin metabolism and the porphyrias. In: Metabolic Control and Disease, 8th ed., Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds), Saunders, 1980.

Watson C. J. Gold from dross: The first century of the urobilinoids, Ann. Intern. Med., 1969, **70**, 839.

Список сокращений

АК	аспартокиназа
АКТГ	адренокортикотропный гормон
АПБ	ацилпереносящий белок
АТКаза	аспартат-транскарбамоилаза
АТСХ	адсорбционная тонкослойная хроматография
АХАТ	ацил-СоА:холестерол ацилтрансфераза
ГАМК	γ-аминомасляная кислота
ГМГ- СоА	3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА	3,4-дигидроксифенилаланин
ДСН	додецилсульфат натрия
ДФГ	2,3-бисфосфоглицерат (дифосфоглицерат)
ЛДГ	лактатдегндрогеназа
ЛПВП	липопротеины высокой плотности
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
ЛХАТ	лецитин:холестерола цилтрансфераза
мРНК	матричная РНК
ПДРФ	полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ПОП	перемежающаяся острая порфирия
ПЭГ	полиэтиленгликоль
РНК	рибонуклеиновая кислота
рРНК	рибосомная РНК
РТСХ	распределительная тонкослойная хроматография
тРНК	транспортная РНК
ХТ	химотрипсин
Цит. *a* (*b*, *c* и т. д.)	цитохром *a* (*b*, *c* и т. д.)
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
Å	ангстрем
Ala	аланин
ALA	аминолевулиновая кислота
AMP	аденозинмонофосфат
Ara	арабиноза
Arg	аргинин
Asn	аспарагин
Asp	аспарагиновая кислота
ATP	адонозинтрифосфат
cAMP	циклический AMP
Cer	церамид
cGMP	циклический GMP
CMP	цитидинмонофосфат
CoA (Q)	кофермент A (Q)
CTP	цитидинтрифосфат
D	оптическая плотность
dA	дезоксиаденозин
dC	дезоксицитидин
dG	дезоксигуанозин
dT	дезокситимидин
dTMP	дезокситимидин-5′-монофосфат
dUMP	дезоксиуридин-5′-монофосфат
E (Enz)	фермент
E_o	окислительно-восстановительный потенциал
FAD	флавинадениндинуклеотид (окисленный)
$FADH_2$	флавинадениндинуклеотид (восстановленный)
FMN	флавинмононуклеотид
Fuc	фукоза
G	ганглиозид
ΔG°	изменение стандартной свободной энергии
Gal	галактоза
GalCer	галактозилцерамид
GalNAC	N-ацетилгалактозамин
GDP	гуанозиндифосфат
GlcCer	глюкозилцерамид
GlcNAC	N-ацетилглюкозамин
Gln	глутамин
Glu	глутаминовая кислота
Gly	глицин
GMP	гуанозинмонофосфат
GTP	гуанозинтрифосфат
Hb	гемоглобин

HbA — нормальный гемоглобин взрослого человека
HbA_2 — минорный гемоглобин взрослого человека
HbF — фетальный гемоглобин
HbS — гемоглобин при серповидноклеточной анемии
His — гистидин
Hyl — гидроксилизин
Hyp — 4-гидроксипролин
IDP — инозиндифосфат
Ile — изолейцин
IMP — инозинмонофосфат
ITP — инозинтрифосфат
IUB — Международный биохимический союз
K_d — константа диссоциации
K_{eq} — константа равновесия
K_M — константа Михаэлиса
Leu — лейцин
Lys — лизин
Man — манноза
Met — метионин
NAD^+ — никотинамидадениндинуклеотид
NADH — никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
$NADP^+$ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленный)
NADPH — никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленный)
NeuAc — ацетилнейраминовая кислота
P_i — неорганический фосфат
P_{O_2} — парциальное давление кислорода
pI — изоэлектрическая точка
Phe — фенилаланин
PP_i — неорганический пирофосфат
Pro — пролин
PRPP — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат
Q_{10} — температурный коэффициент
S — единицы Сведберга
Ser — серин
Thr — треонин
Trp — триптофан
TTFA — теноилтрифторацетон
Tyr — тирозин
UDP — уридиндифосфат
UDPGal — уридиндифосфатгалактоза
UDPGlc — уридиндифосфатглюкоза
UMP — уридинмонофосфат
UTP — уридинтрифосфат
Val — валин
Xyl — ксилоза
$\Delta\mu$ — разность электрохимических потенциалов

Оглавление

Учебное издание

Роберт Марри, Дарил Греннер, Питер Мейес, Виктор Родуэлл

БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА

В 2-х томах
Том 1

Заведующая редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Ведущие редакторы Н. Н. Шафрановская
и Л. Г. Дмитровский
Редактор М. С. Карнюшина
Художник Б. П. Кузнецов
Художественный редактор А. Я. Мусин
Технический редактор А. Л. Гулина
Корректор С. С. Суставова

Лицензия ЛР № 010174 от 20.05.97

Подписано к печати 02.12.98. Формат 84×108/16.
Бумага офсетная № 2. Печать офсетная. Гарнитура
таймс. Объем 12 бум. л. Усл.-печ. л. 40,32.
Уч.-изд. л. 44,84. Изд. № 4/7135.
Тираж 10 000 экз. Заказ 1573. С 025

Издательство «Мир»
Государственного комитета Российской Федерации по печати,
129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленных диапозитивов
в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

Издательство «Мир»
предлагает читателям перевод последнего, 16-го издания одного из самых известных и авторитетных учебников медицины

«Руководство по медицине. Диагностика и терапия» в 2-х томах

Пер. с англ. — М.: Мир, 1997 — 2000 с., ил.

С 1899 г. учебник регулярно обновляется и переиздается в США крупнейшей исследовательской фармацевтической фирмой «Мерк и К°», переведен на 12 языков, тиражи его изданий исчисляются миллионами экземпляров. По словам главного редактора американского издания д-ра Р. Беркоу, «причина, почему этот учебник уже почти 100 лет служит библией для врачей, проста — в ней описаны почти все известные болезни человека и представлены новейшие сведения о том, как их лечить».

В подготовке 16-го издания участвовало свыше 300 авторов и консультантов из США, Англии, Канады и других стран. Текст тщательно выверен и отредактирован, благодаря чему книга может служить надежным справочником по всем разделам медицины — от внутренних болезней, педиатрии и гериартрии до спортивной медицины, стоматологии и народной медицины.

Большое внимание в книге уделяется индивидуальному подходу к больному, проведению опроса и первичного обследования; подробно описываются клинические тесты, симптомы различных расстройств, тактика лечения, возможные меры профилактики.

Руководство предназначено для врачей и студентов-медиков. Оно будет полезно также для среднего медицинского персонала и всех тех, кто интересуется вопросами здоровья и хотел бы иметь подробный медицинский справочник у себя дома.

Приобрести эту и другие книги издательства «Мир» можно в книжных магазинах, непосредственно в издательстве, а также получить по почте наложенным платежом.

Адрес издательства: 129820, Москва, 1-й Рижский пер., 2
Телефоны коммерческой службы: (095) 286-83-88, 286-84-55; 286-82-33; 286-17-72
Факс: (095) 288-9522, e-mail: victor@mir.msk.su

"Книга задумана как учебник биологической химии для студентов-медиков, однако, я считаю, что ценность ее значительно шире, и она могла бы быть использована в качестве одного из стандартных учебников для университетов. Материал в руководстве изложен очень сжато и с удивительной четкостью. Особенно следует подчеркнуть современность учебника и его информативность (схемы, таблицы и прекрасно подобранная библиография) ..."

А.Д. Виноградов, профессор Московского университета

"В книге "Биохимия человека" изложены основные принципы биохимии и молекулярной биологии на самом современном уровне. Она выдержала в оригинале 21 издание общим тиражом более миллиона экземпляров, причем каждое издание подвергалось переработке с учетом новейших данных без существенного увеличения объема. Переведена на 10 языков (французский, немецкий, японский, итальянский, польский и др.)

Первая особенность этого руководства состоит в том, что оно тесно увязывает биохимические вопросы с физиологическими функциями того или иного органа и ткани, а также с наиболее часто встречаемой патологией. Авторы стараются объяснить не только "что происходит" и "как происходит", но и "почему это происходит".

Вторая особенность — исключительная ясность изложения материала, даже сложного. Не удивительно, что книга пользуется успехом не только среди научных работников, но и среди студентов. Первоначально книга собственно и предназначалась для последних, но она переросла лимиты обычного учебника. Достаточно сказать, что общее число иллюстраций, включая формулы, схемы и рисунки, превышает 700..."

А.Н. Климов, академик Академии медицинских наук СССР


9 785030 017747